

Інститут біології тварин  
Національна академія аграрних наук України  
Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ШТАПЕНКО ОКСАНА ВСЕВОЛОДІВНА**

УДК 602.6:592/599;591.33:57.086.83:577.118

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ РЕГУЛЯЦІЇ ГАМЕТОГЕНЕЗУ ДЛЯ**  
**КОРЕКЦІЇ РАНЬОГО ЕМБРІОНАЛЬНОГО РОЗВИТКУ ТВАРИН**  
03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ О. В. Штапенко

Науковий консультант: **Матвієнко Н. М.**, доктор біологічних наук

Київ – 2019

## АНОТАЦІЯ

**Штапенко Оксана Всеволодівна. Біотехнологічні аспекти регуляції гаметогенезу для корекції раннього ембріонального розвитку тварин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, 2019. Дисертаційна робота виконана в Інституті біології тварин НААН Укоаїни, м. Львів.

Дисертація присвячена вивченню впливу екзогенних чинників на процеси спермато- та ембріогенезу тварин *in vitro* та *in vivo* та удосконалення біотехнологічних способів їх регуляції та корекції.

Це наукове завдання вирішене використанням сучасних біотехнологічних методів досліджень на різних модельних системах, що дозволило встановити перебіг гаметогенезу у самок та самців, імплантаційну здатність, особливості ембріогенезу ссавців зумовлених впливом екзогенних факторів та розробити методи активації імплантаційної та ембріональної здатності самиць. Інтенсифікація відтворювальної здатності самиць вимагає створення оптимальних умов для нормального функціонування організму в прегравідарний, гестаційний і період вагітності та передбачає використання біологічно активних речовин, різноманітних препаратів та біотехнологічних прийомів, які сприяють посиленню ендокринного та метаболічного профілю організму, активації обмінних процесів у репродуктивних органах та підвищують відтворювальну здатність.

Розроблено методи об'ємної культуральної системи для культивування ооцитів та ембріонів *in vitro*, а також культивування культур клітин маткового походження на поверхнях, модифікованих різними прищепленими полімерними біологічно сумісними наноповірками.

При оцінці біосумісності нанопокриттів на клітинах лінії NIH3T3 встановлено високу життєздатність клітин, що вказує про відсутність токсичних властивостей досліджуваних компонентів нанопокриттів. Порівняно зміни інтенсивності проліферації ( $p < 0,001-0,01$  і  $p < 0,01$ ) та життєздатності (100-87% і 114,7-72,3%) клітин лінії NIH3T3, ЛДГ активності клітин ( $p < 0,01$ ), вмісту глюкози ( $p < 0,05$ ) при культивуванні на поверхнях модифікованих 3-амінопропіл(триетокси)силаном (АПТЕС) та комплексом АПТЕС з декстраном.

Встановлено, що модифікація поверхні біогелем на основі овальбуміну сприяє підвищенню проліферації, життєздатності культур клітин яйцепроводів та ендометрію, ембріональних фібробластів лінії NIH3T3 впродовж усього періоду культивування, що дозволяє отримати просторово-організовану клітинну систему. При культивуванні клітин яйцепроводів впродовж 3 діб відмічено вірогідне збільшення кількості клітин на 72-гу год культивування у 1-ій дослідній групі з біогелем ( $p < 0,001$ ) та 2-ій групі з альбуміном ( $p < 0,01$ ), у порівнянні до відповідного показника контрольної групи. Найвищий рівень проліферації клітин ендометрію спостерігався у дослідній групі з біогелем. Активність ЛДГ у контрольній та обох дослідних групах на 48-72 год культивування знижувалася відносно її концентрації на 24-ту год культивування, що пов'язано зі зростанням проліферації клітин та їх високою життєздатністю. Встановлено, що метаболічна активність клітин після культивування на біогелі впродовж культивування зростала до 121%, 108,3% та 126,5% і була вищою за показники дослідної групи, клітини якої інкубувалися на нанопокритті з альбуміном. При цьому життєздатність клітин цієї дослідної групи також була високою і знаходилась в межах 117,4-87,7%, а отже нанопокриття з альбуміном не викликає зниження адгезії та проліферації клітин ендометрію.

Повноцінність дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів кролиць у просторово-організованій культуральній системі клітин ендометрію, створеній на основі біогелю була вищою у порівнянні з іншими дослідними

групами. Після 24 год культивування 76,7 % ооцитів дослідної групи, які культивувались на біогелі відновили мейоз і досягнули стадії метафази – II, тоді як кількість ооцитів з полярним тільцем у контрольній групі становила 63,3%. Культивування ОКК на нанопокритті з альбуміном викликає зниження мейотичного дозрівання, і лише 53,4 % ооцитів досягли стадії ооцита другого порядку. Культивування ОКК на поверхні з альбуміном без фідерних клітин ендометрію викликало відновлення мейозу у 46,7 % ооцитів, що пов'язано з дегенеративними змінами (зернистість цитоплазми, втрата округлої форми, вакуолізація) у 36,7 % ооцитів.

Культивування 2-ох клітинних ембріонів миші на об'ємній культуральній системі клітин яйцепроводів та ендометрію, створеній на біогелі, сприяє повноцінному розвитку ранніх ембріонів *in vitro*, стимулює поділ бластомерів, зменшує кількість ембріонів із затримкою розвитку та формуванню бластоцист.

Доведено, що використання культури клітин яйцепроводів кролиць для ко-культивування деконсервованих доїмплантаційних ембріонів миші на 6,38–6,55 % підвищує рівень дроблення до стадії бластоцисти.

При дослідженні впливу стресових чинників на сперматогенез миші виявлено відмінність відповіді на дію гіпертермії у соматичних та статевих клітинах. За дії теплового шоку у сім'яниках мишей встановлено зміни рівня експресії мРНК гена *mDazl* (фактора азооспермії), високий рівень метилтрансферази *Suv39h2* та гістонової деацетилази *Hdac4*, гену *Mdm1*.

Проаналізовано паттерн експресії гена *Cideb* у тканинах мишей за локальної гіпертермії при 42°C. Встановлено високий рівень експресії гена *Cideb* у печінці, кишківнику та нирках і низький – у тканинах шлунку та сім'яниках мишей. Разом з тим, виявлена відмінність експресії гена *Cideb* у сім'яниках та сперматоцитах залежно від ступеню гіпертермії. За температури 38°C експресія гену не змінюється, тоді як за дії помірної гіпертермії при 42°C підвищення експресії *Cideb* у яєчках спостерігається на



2, 6 та 24 годину після теплового стресу. Виявлено альтернативний сплайсинг-варіант гену *Cideb* у сім'яниках за гіпертермії 42°C.

За порівняння тканиноспецифічного впливу солей кадмію хлориду, купруму хлориду і нікелю хлориду на моделі первинних культур клітин встановлено вищу чутливість до цих чинників ембріональних фібробластів корів. Хлориди кадмію і купруму у концентраціях 50-200 мкг/мл чинять виражену цитотоксичну дію на клітини яйцепроводів та ембріональні фібробласти корів. За характером змін проліферативного росту та метаболічної активності ембріональних фібробластів виявлено у 3-6,5 раза вищу токсичну дію кадмію і купруму хлоридів, порівняно з впливом нікелю хлориду. У високих дозах (100 та 200 мкг/мл) купруму хлорид проявляє токсичну дію стосовно культури клітин яйцепроводів, тоді як 0,05 та 0,1 мкг/мл визначено як максимально допустимі концентрації для клітин яйцепроводів корів.

Установлено, що короткотривала дії нікелю хлориду у концентрації 100 мкг/мл на ембріональні фібробласти впродовж 3-ох та 6-ти год культивування призводить до відновлення проліферації клітин, зниження впродовж культивування концентрації глюкози, вмісту Кальцію та Фосфору, що вказує на можливість регенерації проліферативних процесів та функціональної здатності клітин після короткотривалого впливу нікелю хлориду.

За порівняння дії органічних та неорганічних сполук Мангану та Цинку встановлено, що сульфати мангану та цинку в концентрації 0,1 мкг/мл сприяють зниженню росту та життєздатності клітин лінії NIH3T3, тоді як вищі дози глютаму мангану 0,32 мкг/мл та глютаму цинку 0,25 мкг/мл зумовлюють інгібування проліферативної активності культури клітин, зберігаючи при цьому функціональну активність культури. Встановлено оптимальну концентрацію глютаму мангану на рівні 0,08 мкг/мл та глютаму цинку 0,1 мкг/мл, за їх впливу відмічено висока життєздатність клітин (101,78-126,36% та 90,2-99,2% за МТТ-тестом), зниження ЛГД активності

( $p < 0,05$ ) у кондиційному середовищі та зростання індексу проліферації мишачих фібробластів лінії NIH3T3 впродовж культивування.

При тестуванні *in vitro* хром-метіоніну на ембріональних фібробластах та клітинах ендометрію корів встановлено, що концентрація сполуки 0,03 мкг/мл викликає підвищення проліферативної активності обох типів клітин ( $p < 0,01$ ), ( $p < 0,05$ ). Введення хром-метіоніну у вищих концентраціях (0,05 та 0,25 мкг/мл) вірогідно знижує інтенсивність росту ембріональних фібробластів ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) та клітин ендометрію корів ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) впродовж усього періоду культивування.

Досліджено вплив ліпосомальної форми глутамату мангану і цинку на репродуктивну систему та ембріогенез самок щурів. Встановлено, що введення глутамату мангану за 7 діб до запліднення та під час запліднення призводить до вірогідного збільшення на 11,0 % та 18,35 % кількості жовтих тіл вагітності ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ) і на 29,1 % та 39,2 % кількості живих плодів ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ). Одночасно спостерігається зменшення загальної та післяімплантаційної смертності ембріонів порівняно з контрольною групою. Введення до середовища глутамату цинку за 7 діб до запліднення стимулює репродуктивну функцію та ембріогенез самиць щурів, що підтверджується вірогідним підвищенням кількості живих плодів ( $p < 0,001$ ), сумарної маси яєчників ( $p < 0,01$ ), зниженням кількості резорбцій і відсотка доімплантаційної та загальної смертності ембріонів, посиленням ліпідного обміну ( $p < 0,01$ - $0,001$ ). Встановлено, що введення глутамату мангану при заплідненні ефективніше впливає на репродуктивну систему та процеси ембріонального розвитку самок щурів, тоді як дія глутамату цинку найкраще виявляється при застосуванні за 7 діб до запліднення самиць.

Отже, в результаті проведеного скринінгу глутаматів мангану і цинку, хром-метіоніну на культурах клітин встановлено оптимальні дози мікроелементів, вивчено вплив різних доз і способів введення глутамату цинку і мангану, а також хром-метіоніну на відтворювальну здатність та активацію окремих ланок метаболізму у лабораторних тварин, це дозволить

розробити комплексний препарат органічних сполук металів для активації імплантаційної та ембріональної здатності, посилення ембріонально-маткової взаємодії у кролиць.

Експериментально доведено можливість коригування метаболічних процесів, інтенсифікації репродуктивної функції, стимуляції ембріонально-маткових взаємодій та зниження до- та постімплантаційних втрат при вагітності введенням ліпосомального препарату “Ліпоорганік”. Введення кролицям ліпосомального препарату під час осіменіння сприяє збільшенню кількості жовтих тіл вагітності, кількості імплантацій і дозволяє у 2 рази зменшити кількість резорбцій плодів та у 2,3 раза знижує післяімплантаційні втрати. Застосування цього препарату за 14 діб до осіменіння знижує відсоток доімплантаційної загибелі плодів, порівняно до аналогічних показників контрольної групи. Виявлено коригувальний вплив препарату на активність окремих сироваткових ензимів, вміст структурних і резервних ліпідів, процеси пероксидного окиснення ліпідів, ензимну ланку антиоксидантної системи у кролиць в ранній період суcriльності.

На основі проведених досліджень розроблено навчально-методичний посібник «Клітинні культури і можливості їх використання в ембріональній біотехнології», а також методичні вказівки «Отримання функціоналізованих наноповерхонь для культивування клітин, ооцит-кумулюсних комплексів та ембріонів тварин». За результатами роботи отримано 4 патенти України на корисну модель, а також затверджено ТУ на препарат «Ліпоорганік».

*Ключові слова:* репродуктивна біотехнологія, цитотоксичність, біосумісність, тепловий шок, мікроелементи, клітина, ооцити, ембріони, культивування *in vitro*, сім'яники, миші, кролі

## ANNOTATION

**Shtapenko Oksana Vsevolodivna. Biotechnological Aspects of Regulation of Gametogenesis for Correction of Early Embryonic Development of Animals. – Qualifying scientific manuscript.**

Dissertation for the scientific degree of Doctor of Biological Sciences, specialty 03.00.20 – biotechnology. –The National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute» of the Ministry of Education and Science of Ukraine. Kyiv, 2019. Thesis was performed at Institute of Animal Biology of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Lviv.

In the dissertation new data concerning the processes of spermatogenesis and embryogenesis of animals *in vitro* and *in vivo* as influenced by exogenous factors, as well as ways of improvement of biotechnological methods for their regulation and correction are examined.

The solution of this scientific problem was carried out by using modern biotechnological research methods on different model systems, which allowed to determine the course of gametogenesis in females and males, implantation capacity and features of embryogenesis of mammals caused by the influence of exogenous factors and to develop methods for activating the implantation and embryonic capacity of females. It has been established that the intensification of reproductive capacity of females requires creation of optimal conditions for normal functioning of the organism in pregravidder period, gestation and pregnancy, and involves the use of biologically active substances, various preparations and biotechnological methods that contribute to the strengthening of endocrine and metabolic profile of the organism, activation of metabolic processes in reproductive organs and the increase of reproductive ability.

A methodology of cultivating of uterine cells on surfaces modified by various grafted polymeric biocompatible nanolayers, while creating a 3D cell culture system for cultivation of oocytes and embryos *in vitro*, was developed. A high viability of

cells NIH3T3 lines while assessing the biocompatibility of nanolayers was determined. The comparison of proliferative growth ( $p<0.001$ - $0.01$  and  $p<0.01$ ), enzymatic activity ( $p<0.01$ ), glucose concentration ( $p<0.05$ ) and viability (100-87% and 114, 7-72.3%) of the NIH3T3 cell line showed that the most positive effect was observed after cultivation on surfaces modified by 3-aminopropyl (triethoxy) silane (APTES) and APTS containing dextran. It was found that the modification of the surface by ovalbumin based biogel leads to improved viability and proliferation of oviduct and uterine cells of the NIH3/T3 cell line throughout all the period of cultivation that allows to obtain a spatially-organized cellular system. Improved viability and proliferation of oviduct cells during cultivation in experimental groups was observed, and after 72 hours the number of cells were significantly higher in experimental group with biogel ( $p<0.001$ ) and albumin ( $p<0.01$ ) ( $p<0.001$ ), as compared to similar indices of the control group. The highest level of proliferative growth of endometrial cells was observed in the experimental group with biogel. LDH activity in control and both experimental groups was decreased after 48-72 hours of cultivation as compared to their concentration at 24 hours of cultivation, which coincides with the growth of proliferative activity of cells and high cell viability in these groups. The cell viability, as determined by MTT assay, in experimental group with biogel during cultivation increased by 121%, 108.3% and 126.5% and was higher than that in the experimental group whose cells were incubated onto nano-coating with albumin. At the same time, the vitality of cells in this experimental group was also high, within the range of 117.4-87.7%, indicating that the modification of the surface by albumin does not reduce the adhesion and proliferation of endometrium cells.

It was found that the maturation of rabbit oocyte-cumulus complexes onto 3D cell culture system with endometrial cells created on biogel was higher as compared to other experimental groups. It was established that after 24 hours of cultivation on biogel, 76,7 % oocytes of the experimental group recovered meiosis and reached the metaphase stage II, while the number of oocytes with the polar body in the control group was 63.3%. The culturing of oocyte-cumulus complexes onto nano-

coating with albumin caused a decrease of meiotic maturation, and the second-order oocyte stage was reached only by 53.4% of oocytes. The culturing of oocyte-cumulus complexes onto surface with albumin without uterine feeder cells decreased the number of oocytes which reached the meiosis down to 46.7% due to degenerative changes (granularity of the cytoplasm, loss of round form, vacuolation) in 36.7% of oocytes.

The culturing of 2-cell mouse embryos onto volumetric culture system with endometrial cells created on the biogel promoted the development of pre-implantation embryos *in vitro*, stimulated the blastomerization and blastocyst formation and reduced the number of embryos with delayed development.

It has been proved that co-culturing of cryopreserved preimplantation mice embryos on the monolayer of oviduct rabbit cells increases the number of embryos reaching the blastocyst stage by 6.38-6.55%.

While studying the influence of stress factors on the spermatogenesis of mice, a difference in response to the action of hyperthermia in somatic and germ cells was revealed. It has been shown that the effects of heat shock on mice testicles alter the activity of the mDazl gene (azoospermia factor) and increase the expression level of methyltransferase *Suv39h2*, *Hdac4* histone deacetylase and *Mdm1* gene.

The pattern of the *Cideb* gene expression in mice tissues under the influence of local hyperthermia was analyzed. High expression levels of *Cideb* genes were observed in liver, intestine and kidneys, with low levels thereof found in the stomach and testis tissues of mice after a heat shock. However, a difference in the *Cideb* gene expression in the testes and spermatocytes depending on the degree of hyperthermia was detected. The expression of the gene does not change at 38°C, whereas in the case of a moderate hyperthermia of 42°C, the *Cideb* gene expression was observed in testes at 2, 6 and 24 hours after the heat stress. An alternative splice variant of the *Cideb* gene in the testes at the hyperthermia of 42°C was found.

The comparison of tissue-specific effects of cadmium chloride, copper chloride and nickel chloride in the model of primary cell cultures showed a higher sensitivity of fetal embryonic fibroblast cells. Cadmium and copper chlorides, in the concentration range of 50-200 µg/ml, have a pronounced cytotoxic effect on both cell cultures. By the nature of changes in the proliferative growth and metabolic activity of the cells of embryonic fibroblasts, 3-6.5 times higher, on the average, toxic effects of cadmium and copper chlorides were detected, in comparison with the influence of nickel chloride. Toxic effects of high doses of copper chloride (100 and 200 µg/ml) on the culture of oviduct cells have been established, whereas the concentrations of 0.05 and 0.1 µg/ml were defined as maximum tolerances for bovine oviductal cells.

It has been established that the short-acting influence of nickel chloride at a concentration of 100 µg/ml on the cells of embryonic fibroblasts during 3 and 6 hours of cultivation leads to the recovery of proliferative growth of cells, reduction of glucose level, calcium and phosphorus content during cultivation, which indicates the possibility of regeneration of proliferative processes and cellular function after a short-term exposure to the compound.

The comparison of the action of organic and inorganic salts of manganese and zinc showed that manganese and zinc sulfates in the concentration of 0.1 µg/ml lead to a decrease of proliferative growth and viability of NIH3T3 cells, while higher concentrations of manganese glutamate and zinc glutamate, 0.32 µg/ml and 0.25 µg/ml respectively, slightly inhibit the cell growth, while maintaining the functional activity of the culture. The optimal concentration of manganese glutamate was established to be on the level of 0.08 µg/ml, that of zinc glutamate being 0.1 µg/ml, as evidenced by high viability of NIH3T3 cells (101.78-126.36% and 90.2-99.2% by MTT assay), a significantly decreased LHD activity ( $p < 0.05$ ) in the culture medium and an increase the index of proliferation of mouse fibroblasts cells during cultivation.

The testing *in vitro* of the action of chromium methionine on embryonic fibroblasts and endometrial cows found that chrome compound in the

concentration of 0.03 µg/ml lead to a increase of proliferative activity of both cell types ( $p<0.01$ ), ( $p<0.05$ ). The introduction of chromium methionine at higher concentrations (0.05 and 0.25 µg / ml) significantly inhibit the cell growth of embryonic fibroblasts ( $p<0.01$ ;  $p<0.001$ ) and cows endometrial cells ( $p<0.01$ ;  $p<0.001$ ) during the whole period of cultivation.

The effects of manganese and zinc glutamate in liposomal forms on the reproductive system and embryogenesis of female rat were investigated. Experimental results showed that the administration of Mn glutamate 7 days before fertilization and during fertilization significantly increased at 11,0 % and 18,35 % the number of corpora lutea of pregnancy ( $p<0.001$ ) and at 29,1 % and 39,2 % the number of live fetuses ( $p<0.001$ ) and decreased general and preimplantation embryonic mortality as compared with the control group. It was determined that the administration of zinc glutamate 7 days before fertilization stimulated the reproductive function and embryogenesis of female rats. We observed a significant increase of the number of live fetuses ( $p<0.001$ ) and of total ovarian mass ( $p<0.01$ ), a decrease of the number of resorptions and of the percentage of preimplantation and total embryonic mortality, as well as an enhanced lipid metabolism ( $p<0.01-0.001$ ). It has been established that manganese glutamate more effectively influences the reproductive system and processes of embryonic development of females of rats during fertilization, whereas zinc glutamate has the best effect when administered 7 days before fertilization.

Consequently, the screening of organic compounds of manganese, zinc and chromium on cell cultures, performed in order to determine the optimal concentration of trace elements and to study the effects of various doses and methods of zinc and manganese glutamates and chromium methionine administration on reproduction and activation of particular levels of metabolism in laboratory animals, allowed to develop a preparation containing organic trace elements for the activation of implantation and embryonic capacity, improvement of embryonal-uterine interaction in female rabbits.



Our studies indicated that the administration of the "Lipoorganic" liposomal preparation had a beneficial effect on the correction of metabolic processes, intensification of reproductive function, stimulation of embryo-uterine interactions and reduction of pre- and post-implantation losses during pregnancy. The liposomal preparation administered to female rabbits during insemination resulted in an increased number of corpora lutea of pregnancy and an elevated number of implantations, as well as allowed to reduce by half the number of fetus resorptions and to diminish post-implantation losses by 2.3 times, while the use of the preparation 14 days prior to insemination reduced the percentage of pre-implantation loss of fetuses, as compared to similar indices of the control group. A corrective effect of the preparation on the activity of some serum enzymes, the content of structural and reserve lipids, metabolism intensity, as well as on the maintenance of antioxidant-prooxidant balance in reproductive organs improving fertilization and rabbits embryo implantation, was found in female rabbits in the early period of pregnancy.

On the basis of the conducted research, a Methodical Manual "Cell Cultures and the Possibilities of Their Use in Embryonic Biotechnology", Methodical Instructions "Obtaining of Functional Nanosurfaces for Cell Cultivation, Oocytes-Cumulus Complexes and Animal Embryos", 4 patents of Ukraine, as well as Technical Specifications of Ukraine for the "Lipoorganik" preparation were developed.

*Key words:* cytotoxicity, biocompatibility, cell, embryonic mortality, female rats, female rabbits

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Монографія:*

1. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / [Влізло В. В., Федорук Р. С., Ратич І. Б.,..... Штапенко О. В. та ін.]; за ред. В. В. Влізла. — Львів: Сполом, 2012. — 764 с. *(Здобувачем взято участь у написанні окремих методів розділу 6, 23 та 32 довідника та інтерпретації даних).*

### *Статті у фахових закордонних виданнях:*

2. Raczowska J. Temperature-responsive peptide-mimetic coating based on poly(N-methacryloyl-L-leucine): properties, protein adsorption and cell growth / M. Ohar, Yu. Stetsyshyn, Zemla J., K. Awsiuk, J. Rysz, K. Fornal, A. Bernasik, H. Ohar, S. Fedorova, **O. Shtapenko**, S. Polovkovych, V. Novikov, A. Budkowski // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2014. – 118. – P. 270-279 (*Scopus*). *(Здобувачем виконано експериментальну частину на культурі клітин, проведено статистичну обробку даних та їх аналіз).*
3. **Shtapenko O.** Effect of liposomal prepartate with some organic trace elements on antioxidant status and reproductive ability of female rabbits / O. Shtapenko, I. Gevkan, Ye. Dzen`, S. Fedorova, Yu. Sluvchyk, V. Syrvatka, I. Matiukha // Scientific Papers. Series D. Animal Science. Vol. LVIII, 2015 ISSN 2285-5750. — P. 221-227 (*Web of Science*). *(Здобувачем виконано дослідження, узагальнено отримані дані та написано статтю).*
4. **Shtapenko O.** Comparative toxicity screening of organic and inorganic copper salts on oviduct epithelial cell culture in vitro / O. Shtapenko, I. Hevkan, S. Fedorova, Yu. Slyvchuk, I. Matuha, V. Syrvatka // Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds. – Rzeszów, 2015. – P. 215-223. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, узагальнено одержані результати та написано статтю).*
5. **Shtapenko O.** The influence of trace elements in the form of liposomal compounds on antioxidant defense system and parameters of oxidative stress in the reproductive organs of female rabbits / O. Shtapenko, I. Matiukha, I.

Hevkan, H. Tkachenko // Slupskie Prace Biologiczne — 2015. — № 12. — P. 173-186. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, опрацьовано літературні дані, написано статтю).*

**Статті у вітчизняних фахових виданнях:**

6. **Shtapenko O. V.** Formation and properties polymer nanolayers to enhance cell growth *in vitro* / O. V. Shtapenko, I. I. Gevkan, Yu. I. Sluvchyk, V. Y. Syrvatka, N. M. Matvienko // Innov. Biosyst. Bioeng. — 2018. — Vol. 2, no. 2. — P. 105-109. *(Здобувачем проведено дослідження, їх аналіз, опрацьовано літературні дані та написано статтю).*
7. **Shtapenko O. V.** Effect of organic microelements liposomal form on fertilizing ability and antioxidant status of female rabbits / O. V. Shtapenko, I. I. Gevkan, Yu. I. Sluvchyk, Ye. O. Dzen`, V. Y. Syrvatka, N. M. Matvienko // Biotechnologia Acta. — 2018. — Т. 11, № 4. — С. 50-56. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз одержаних даних та написано статтю).*
8. **Штапенко О. В.** Особливості цитотоксичного впливу кадмій хлориду на клітини *in vitro* // О. В. Штапенко, І. І. Гевкан, Ю. І. Сливчук // Біологія тварин. — 2018. — Том 20, №1. — С. 123-130. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*
9. **Штапенко О. В.** Вплив хлориду нікелю на морфофункціональні та метаболічні характеристики клітин *in vitro* / О. В. Штапенко, Ю.І. Сливчук, І. І. Гевкана // «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. — 2018. — № 2(73). — С. 68-73. *(Здобувачем проведено дослідження, їх аналіз, опрацьовано літературні дані та написано статтю).*
10. **Штапенко О. В.** Вплив органічної сполуки манган глютамату на імплантаційну здатність самок щурів / О. В. Штапенко, І.І. Гевкан, Ю. І. Сливчук, В.Я. Сирватка, Н.М. Матвієнко // Вісник проблем біології та медицини. — 2018. — Том 9, Вип. 2. — С. 171-175. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

11. **Штапенко О. В.** Ефективність ДНК інтеграції і виживаність зигот мишей за умов пронуклеарної мікроін'єкції / О. В. Штапенко, А. В. Мадіч, С. В. Федорова // Вісник Львівського університету ім. Івана Франка. Серія біологічна. — 2017. — Вип. 76. — С. 45-53. *(Здобувачем проведено дослідження, опрацьовано літературні дані та написано статтю).*
12. **Shtapenko O.** The influence of surfaces modified by different polymeric on the growth of mouse embryonic fibroblasts cell line NIH3T3 / **O. Shtapenko** // Біологія тварин. — 2017. — Том 19, №2. — С. 121-126.
13. **Штапенко О. В.** Вплив об'ємної клітинної системи на дозрівання ранніх ембріонів мишей *in vitro* / О. В. Штапенко, Н.М. Матвієнко // «Науковий вісник Чернівецького університету. Серія: Біологія (Біологічні системи)». — 2017. — Том 9, Вип. 1. — С. 51-56. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їх аналіз, опрацьовано літературні дані та написано статтю).*
14. **Штапенко О. В.** Обмін речовин за стимуляції відтворювальної здатності кролиць препаратом органічних мікроелементів у формі ліпосомальної емульсії / О. В. Штапенко, І.І. Гевкан, Ю. І. Сливчук, В.Я. Сирватка // «Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)». — 2017. — Том 9, Вип. 2. — С. 171-175. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз одержаних даних та написано статтю).*
15. **Shtapenko O.** Development of non- and vitrified-thawed pronuclear-stage mouse embryos co-cultured with oviduct epithelial cells / O. Shtapenko, S. Fyodorova, A. Madich // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. — 2013. — Вип. 2(64). — С. 15-17. *(Здобувачем виконано дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*
16. **Огар М.** Формування та властивості декстрановмісного покриття для контрольованої адсорбції альбуміну та вирощування клітин / М. Огар, Ю. Стецишин, А. Коструба, Н. Марінцова, Л. Журахівська, С. Федорова, **О. Штапенко**, В. Новіков // ДАН України. — 2013. — №5. — С. 511-517.

*(Здобувачем виконано основну частину експериментального дослідження, аналіз одержаних даних та написано статтю).*

17. Федорова С.В. Проліферативний ріст та біохімічні зміни кондиційного середовища як показники функціональності за культивування клітин яйцепроводів кролів на модифікованих покриттях / С.В. Федорова, **О.В. Штапенко**, І.І. Гевкан, І.О. Матюха, О. Жолобко, М. Огар, Ю.Б. Стецишин, Ю. І. Сливчук // Біологія тварин. — 2013. — Том 15, №4. — С. 134-140. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз одержаних даних та написано статтю).*
18. **Штапенко О. В.** Вплив гіпертермії на експресію генів у тканинах мишей / О. В. Штапенко // Вісник Львівського університету ім. Івана Франка. Серія біологічна. — 2013. — Вип. 62. — С. 126-132.
19. **Штапенко О.В.** Вплив хром метіоніна на проліферативний ріст культури клітин ембріонального фібробласту / О. В. Штапенко // Аграрний вісник Причорномор'я / Збірник наукових праць. — 2012 — Вип. 62. — С. 158-162.
20. **Штапенко О.** Вплив модифікованих поверхонь скла на адгезію та проліферацію клітин меланоми миші лінії В16F10 / О. Штапенко, С. Федорова, І. Гевкан, Ю. Стецишин, О. Жолобко, М. Огар // Біологія тварин. — 2011. — Т. 13, №1-2. — С.484-487. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*
21. Федорова С.В. Вміст ТБК-активних продуктів і гідроперекисів ліпідів та активність ферментів антиоксидантного захисту в гомогенатах внутрішніх органів самиць щурів при стимуляції ембріонально-маткового сигналу за умов введення селенвмісного препарату / С. В. Федорова, І. І. Гевкан, **О. В. Штапенко**, Ю. І. Сливчук // Біологія тварин. — 2010— Том 12, №1. — С. 100-105. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та аналіз одержаних даних).*

22. **Штапенко О.В.** Проліферативний ріст фідерних клітин яйцепроводів у культурі при дії хлоридів кадмію, міді та нікелю/ О. В. Штапенко // Аграрний вісник Причорномор'я. — 2010. — Вип.52. — С.104-108.
23. Мадіч А. Особливості одержання культури клітин ембріонального фібробласту овець / А. Мадіч, С. Федорова, І. Гевкан, Р. Кхан, **О. Штапенко**, Ю. Сливчук // Вісник Львівського університету ім. Івана Франка. Серія біологічна. — 2007. — Вип. 45. — С. 175-180. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, аналіз одержаних даних та взято участь у написанні статті).*

#### Праці у інших виданнях:

24. Клітинні культури і можливості їх використання в ембріональній біотехнології: навчально-методичний посібник (рекомендовано Міністерством освіти і науки, спорту та молоді Лист МОНмолодьспорту № 1/11 від 13.01.2012 року) / А. В. Мадіч, В. І. Шеремета, І. І. Гевкан, С. В. Федорова, **О. В. Штапенко**, Ю. І. Сливчук; К.: АртЕконом, 2012. — 144 с.: *(Здобувачем опрацьовано літературні дані та взято участь у написанні 6-х розділів посібника).*
25. Отримання функціоналізованих наноповерхонь для культивування клітин, ооцит-кумулясних комплексів та ембріонів тварин: метод. реком.; затв. вченою радою Інститут біології тварин (протокол №5 від 16.09.2015 р.) / **О. В. Штапенко**, І.І. Гевкан, Ю. Б. Стецишин, С. В. Федорова, Ю. І. Сливчук, В. Я. Сирватка; «ДНДКІ ВП КД». Львів, 2015. 28 с. *(Здобувач є співавтором усіх розділів).*
26. Технічні умови України (ТУ У) 21.2-30995014-00:2018 Препарат «Ліпоорганік» / **Штапенко О. В.**, Дзень Є. О. — 21 с. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, узагальнено результати і написано ТУ У).*

#### Патенти України на корисну модель:

27. Спосіб одержання фідерних клітин яйцепроводів: деклар. пат. на корис. модель 47452, Україна / Мадіч А.В., Гевкан І. І., **Штапенко О.В.**, Сливчук

- Ю.І., Федорова С. В.; № u200904658 заявл. 12.05.2009; опубл. 10.02.2010, Бюл. №3. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження та взято участь в оформленні патенту на корисну модель).*
- 28.Спосіб зниження рівня ембріональної смертності у кролематок: деклар. пат. на корис. модель 56695, Україна / **Штапенко О.В.**, Гевкан І. І., Дзень Є. О., Федорова С. В. № u20108053 заявл. 29.06.2010; опубл. 25.01.2011, Бюл. №2. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження та взято участь в оформленні патенту на корисну модель).*
- 29.Спосіб активації проліферативних процесів в культурі клітин епітелію яйцепроводів: деклар. пат. на корис. модель 51687, Україна / Гевкан І. І., Нікітенко А.М., **Штапенко О.В.**, Сливчук Ю.І., Федорова С. В. № u201001506 заявл. 15.02.2010; опубл. 26.07.2010, Бюл. № 14. *(Здобувач брала участь у проведенні досліджень та оформленні патенту на корисну модель).*
- 30.Середовище для підвищення активності проліферації клітин різних типів: деклар. пат. на корис. модель 54749, Україна / Сливчук Ю.І., Гевкан І.І., **Штапенко О.В.**, Федорова С.В. № u201005025; опубл. 25.11.2010, Бюл. № 22. *(Здобувач брала участь у проведенні досліджень та оформленні патенту на корисну модель).*
- 31.Препарат «Ліпорганік» для підвищення відтворювальної здатності кролематок: деклар. пат. на корис. модель 105740, Україна / **Штапенко О.В.**, Гевкан І.І., Сливчук Ю.І., Дзень Є.О., Сирватка В.Я., Матюха І. О., Федорова С. В. № u201505160 заявл. 26.05.2015; опубл. 11.04.2016, Бюл. № 7. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження та взято участь в оформленні патенту на корисну модель).*

***Матеріали наукових конференцій, конгресів, симпозіумів та з'їздів:***

- 32.Mikolajec M. The heat shock regulates *Mdm1* gene expression in spermatocytes / M. Mikolajec, A. Wojtas, **O. Shtapenko**, J. Korfanty, M. Kus-Liskiewicz, N. Vydra, A. Toma, W. Widlak // XLV Annual Meeting of the Polish Biochemical Society (September 20-23, 2010, Wisla, Poland). — 2010. — P. 133.

*(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, які стосувалися клонування гену Mdm1).*

33. Kus-Liskiewicz M. Hsf1, the main regulator of the heat shock response, can act as transcriptional repressor / M. Kus-Liskiewicz, J. Polańska, M. Olbryt, J. Korfanty, A. Wojtas, **O. Shtapenko**, N. Vydra, A. Toma, W. Widlak // XIVth Gliwice Scientific Meetings (November 26-27, 2010, Gliwice, Poland). — 2010. — P. 71. *(Здобувачем виконано частину експериментального дослідження).*
34. Mikolajec M. Mdm1 gene expression in spermatocytes is regulated by the heat shock transcription factor 2 / M. Mikolajec, A. Wojtas, **O. Shtapenko**, J. Korfanty, M. Kus-Liskiewicz, N. Vydra, A. Toma, W. Widlak // XIVth Gliwice Scientific Meetings (November 26-27, 2010, Gliwice, Poland). — 2010. — P. 73. *(Здобувачем виконано основну частину експериментального дослідження).*
35. **Штапенко О.В.** Стимуляция репродуктивной функции кролематок и оценка их физиолого-биохимических показателей крови при воздействии хром-метионина / О.В. Штапенко, Е.А. Дзень, С.В. Фёдорова // XV междунар. научно-практическая конф. «Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства», (октябрь 2012, г. Горки). — С. 60-65. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, написано тези).*
36. Федорова С. Пролиферативный рост как показатель функциональности и отсутствия цитотоксичности модифицированных нанопокровов при культивировании клеток эмбриональных фибробластов мышей линии NIH3T3 / С. Федорова, **О. Штапенко**, І. Гевкан, Ю. Стецишин, О. Жолобка, М. Огар // Сборник материалов. Ставрополь, Россия. — 2012. — С. 199-203. *(Здобувачем виконано основну частину експериментального дослідження, підготовлено тези до друку).*
37. **Штапенко О.В.** Аналіз рівня експресії генів у сім'яниках мишей за дії теплового шоку // Тези доповідей VI Міжнар. конф. молодих вчених



- “Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.” (13-17 травня, 2013 р., м. Одеса). — Збірник наук. матеріалів Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова — 2013. — С. 301.
38. **Shtapenko O.** Survival and development of pronuclear-stage mouse embryos after droplet vitrification in different vitrification solutions / O. Shtapenko, S. Fyodorova, A. Madich // «Mammalian Embryology Conference. Celebrating Work of Professor Andrzej K. Tarkowski» (25-26 October 2013 Warsaw, Poland). — 2013. — Р. 55. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, написано тези).*
39. **Ohar M.** Formation, structure and properties grafted sensitive polymer nanolayers on the base of the amino-acid derivatives / M. Ohar, Y. Stetsyshyn, A. Kostruba, J. Raczkowska, N. Marintsova, S. Fyodorova, **O. Shtapenko**, V. Novikov // International conference «Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2013)» (25 August-1 September 2013, Bukovel, Ukraine). — Abstract book — Bukovel, Ukraine. — 2013. — Р. 299. *(Здобувачем узагальнено результати досліджень, взято участь у підготовці тез до друку).*
40. **Огар М.** Формування біосумісних термочутливих полімерних покриттів на основі полі(N-метакрилоїл-L-фенілаланіну) / М. Огар, Ю. Стецишин, А. Коструба, Н. Марінцова, С. Федорова, **О. Штапенко**, В. Новіков // Національна науково-технічна інтернет-конференція з міжнародною участю «Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно-активних сполук та фармацевтичних препаратів» (23-25 квітня 2013 р. Львів). — С. 58. *(Здобувачем виконано узагальнення даних, взято участь у підготовці тез до друку).*
41. **Огар М.О.** Біологічно- активні прищеплені полімерні наношари полі(N-метакрилоїл-L-амінокислот) на поверхні скла / М. Огар, Ю. Стецишин, Н. Марінцова, С. Федорова, **О. Штапенко**, В. Новіков // Збірник тез доповідей IX Міжнародної конференції da Rostim 2013. “Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно активні сполуки для сільського

- господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища" (7-10 Жовтня 2013, м. Львів). – Тези допов. Львів: Нац. ун-т "Львівська політехніка". – 2013.– С.99-100. *(Здобувачем проаналізовано наукові дані, взято участь написанні тез).*
42. Raczkowska J. Temperature-responsive peptide-mimetic coating based on poly(N-methacryloyl-L-leucine): Properties, protein adsorption and cell growth / Joanna Raczkowska, Mariya Ohar, Yuriy Stetsyshyn, Joanna Zemła, Kamil Awsiuk, Jakub Rysz, Katarzyna Fornal, Andrzej Bernasik, Halyna Ohar, Svitlana Fedorova, **Oksana Shtapenko**, Svyatoslav Polovkovych, Volodymyr Novikov, Andrzej Budkowski // 8<sup>th</sup> ECNP International Conference on Nanostructured Polymers and Nanocomposites (September 14-16, 2013, Dresden, Germany). – Р. О30. *(Здобувачем виконано частину експериментального дослідження, взято участь у написанні тез).*
43. **Штапенко О. В.** Клонування гену *mdm 1* мишей та його експресія у трансформованих клітинах // Український біохімічний конгрес (6-10 жовтня 2014, м. Київ). – 2014.– Т. 86, № 5 (1). – с. 229.
44. **Shtapenko O.** Influence of some organic trace elements on biochemical profile and reproductive function of female rabbits / /O. Shtapenko, I. Hevkan, Ye. Dzen`, S. Fedorova, Y. Slyvchuk, V. Syrvatka, I. Matuha // KRMIVA 2014, 21th International Conference (4 - 6 June, 2014, Opatija Hrvatska, Croatia). – 2014.– Р. 60. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано тези).*
45. **Shtapenko O.** The influence of chromium methionine supplementation on haematological and biochemical indices and reproductive function of female rabbits during early pregnancy / O. Shtapenko, I. Hevkan, Ye. Dzen`, S. Fedorova // 5th International Young Scientists Conference „Human – Nutrition – Environment” “Biotechnology for sustainable development” (24-25 April, 2014, Rzeszów, Poland). – 2014.– Р. 60. *(Здобувачем виконано узагальнення даних та написано тези).*

46. **Shtapenko O.** Effect of some microelements in liposomal forms on blood parameters in female rabbits during gestation / O. Shtapenko, I. Hevkan, Y. Dzen`, S. Fedorova, Y. Slyvchuk, V. Syrvatka, I. Matuha // International Scientific Symposium “Modern animal husbandry – strategies, opportunities and performances” (23-25 October, 2014, Iasi, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Romania). – 2014. – P. 36. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано тези).*
47. **Штапенко О. В.** Порівняння проліферативної здатності клітин ендометрію при культивуванні на біогелі та модифікованому альбуміном покритті / О. В. Штапенко, С. В. Федорова, Ю. Б. Стецишин // Міжнар. науково-практична конференція “Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини” (2-3 жовтня 2014, м. Львів). – 2014. – С. 217. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано тези).*
48. **Shtapenko O.** Effect of the surfaces modified by different bioactive polymeric on the cell viability and proliferation / O. Shtapenko, S. Fedorova, I. Gevkan, Yev. Dzen`, Yu. Stetsyshyn // 9th International Conference – “Structure and Stability of Biomacromolecules” (SSB 2015). – Kosice, Slovakia. – 2015. – P. 128-129. *(Здобувачем виконано узагальнення даних та написано тези).*
49. **Shtapenko O.** Changes in activities of antioxidant enzyme and biochemical indices in blood during gestation in rabbits under influence of some organic microelements in liposomal form / O. Shtapenko, Y. Dzen`, S. Fedorova, Y. Slyvchuk // XIIth International Conference of Young Researchers „Physiology and Biochemistry in Animal Nutrition” (23-24 September 2015, Łowicz, Poland). – 2015. – P. 58. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано тези).*
50. **Shtapenko O. V.** The impact of introduction organic microelements in liposomal form on oxidative stress biomarkers and antioxidant system in tissues of female rabbits / O. V. Shtapenko, , I. O. Matiukha, I. I. Gevkan // Біологія

тварин. Тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини», присвяченої 55-річчю Інституту біології тварин НААН.– 2015. – Т. 17, № 3. – С. 188. *(Здобувачем виконано постановку експериментів, проведено аналіз отриманих даних та написано тези).*

51. **Shtapenko O.** The influence of organic zinc, manganese and chromium in liposomal form on antioxidant status and pregnancy outcome in rabbits // 20th International Symposium on Housing and Diseases of Rabbits, Furproviding Animals and Pet Animals (May 17 - 18, 2017, Celle, German). *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано тези).*

52. **Штапенко О. В.** Вплив просторово-організованої культуральної системи клітин гранульози на дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів / О. В. Штапенко, І. І. Гевкан, В. Я. Сирватка, Ю. І. Сливчук // Тези V Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2017). — 2017. *(Здобувачем виконано планування експериментального дослідження, проведено аналіз отриманих даних та написано тези).*

53. **Shtapenko O.** “Effect of zinc glutamate on embryogenesis of female rats” / Shtapenko O., Hevkan I., Dzen` Ye., Slyvchuk Y., Syrvatka V. // XXIV Symposium of immunology and reproduction with international participation (May 17-19, 2018, The Castle, Trest, Czech Rebuclica). *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, написано тези).*

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....</b>	<b>29</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>31</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>40</b>
1.1. Застосування біотехнологічних методів у тваринництві.....	40
1.2. Епігенетична регуляція геному.....	51
1.2.1. Епігенетичні модифікації в гамето- та ембріогенезі за впливу екопатологічних чинників.....	53
1.2.2. Мейотична інактивація статевих хромосом під час сперматогенезу.....	59
1.3. Вплив екологічних чинників на репродуктивну функцію.....	68
1.3.1. Біологічна дія важких металів на репродуктивну функцію.....	70
1.3.2. Біотехнологічні методи стимулювання відтворювальної здатності за впливу біогенних мікроелементів.....	75
1.4. Обґрунтування напрямку досліджень.....	84
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>88</b>
2.1. Загальна схема досліджень.....	89
2.2. Мікроін'єкція генетичної конструкції у пронуклеус зиготи миші....	92
2.3. Трансплантація зигот.....	93
2.4. Аналіз біосумісності нанопокриттів на біологічних моделях.....	95
2.4.1. Наноповерхні.....	96
2.4.2. Клітини та їх культивування.....	98
2.4.3. Отримання ооцит-кумулюсних комплексів кроликів та їх культивування.....	99
2.4.4. Культивування <i>in vitro</i> ембріонів миші.....	100
2.5. Моделювання впливу теплового стресу на тваринах.....	104
2.6. Молекулярно-біологічні дослідження.....	105
2.6.1. Виділення сумарної РНК з тканин.....	105

	26
2.6.2. Зворотня транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція....	106
2.6.3. Методи молекулярного клонування.....	108
2.6.4. Тимчасова трансфекція клітин.....	112
2.6.5. Вестерн-блот-аналіз протеїнів клітин.....	113
2.7. Дослідження запліднюючої та імплантаційної здатності тварин.....	115
2.8. Біохімічні методи досліджень.....	124
2.9. Статистичний аналіз даних.....	126
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>128</b>
3.1. Удосконалення методів ембріональної біотехнології.....	128
3.1.1 Вплив мікроін'єкції генетичної конструкції <i>pGEMA2-1700094C09Rik</i> на розвиток зигот <i>in vitro</i> .....	128
3.1.2. Ефективність інтеграції ДНК і виживаності зигот миші за пронуклеарної мікроін'єкції.....	130
3.1.3. Вітрифікація ембріонів миші на стадії 2-ох про нуклеусів.....	133
3.1.4. Застосування культури клітин яйцепроводів для розвитку деконсервованих ембріонів миші.....	135
3.2. Створення об'ємної культуральної системи для забезпечення дозрівання ооцитів і розвитку ранніх ембріонів <i>in vitro</i> .....	138
3.2.1. Скринінг біосумісності нанопокриттів на мишачих ембріональних фібробластах лінії NIH3T3 і клітинах лінії HEK-293 ембріона нирки людини.....	138
3.2.2 Вплив різних нанопокриттів на проліферативну та метаболітичну активність клітин яйцепроводів корів <i>in vitro</i> .....	149
3.2.3. Ефективність покриттів біогелю природнього походження та нанопокриття альбуміну за культивування фібробластів лінії NIH3T3 миші та клітин яйцепроводів і ендометрію кролиць.....	153
3.2.4. Повноцінність дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів кролиць у просторово-організованій культуральній системі клітин	

ендометрію, створеній на основі біогелі та нанопокриття з альбуміном.....	165
3.2.5. Вплив об'ємної культуральної системи клітин яйцепроводів кролиць, створеної на основі біогелю та альбуміномі, на дозрівання ранніх ембріонів до трансферабельних стадій.....	166
3.2.6. Культивування 2-ох клітинних ембріонів миші в об'ємній культуральній системі клітин ендометрію кролиць на біогелі природнього походження та нанопокритті з альбуміном.....	170
3.3. Вплив екзогенних чинників на оогенез- та ембріогенез тварин	172
3.3.1. Цитотоксичний вплив кадмію хлориду на ембріональні фібробласти залежно від його тривалості.....	173
3.3.2. Зміни окремих біохімічних показників клітин яйцепроводів за дії хлоридів купруму та нікелю.....	180
3.4. Вплив гіпертермії на сперматогенез миші.....	194
3.4.1. Рівень експресії окремих генів за дії теплового шоку.....	194
3.4.2. Виявлення альтернативних сплайсинг-варіантів гена <i>Mdm1</i> у сім'яниках миші.....	199
3.4.3. Експресія гена <i>Cideb</i> у тканинах самців миші за впливу теплового шоку.....	206
3.5. Біотехнологічні підходи до стимуляції відтворювальної здатності самок кролиць за участі біогенних мікроелементів.....	210
3.5.1. Встановлення оптимальної концентрації органічних сполук Мангану, Цинку та Хрому на клітинах лінії NIH3T3 та клітинах яйцепроводів і ендометрію кролиць.....	210
3.5.2. Вплив хром-метіоніну на запліднення та ранній ембріональний розвиток у кролів.....	224
3.5.3. Запліднювальна та імплантаційна здатність самиць щурів за впливу мангану і цинку глутамату.....	233

3.5.4. Вплив комплексного ліпосомального препарату органічних сполук мікроелементів на репродуктивну функцію у тварин.....	243
3.5.5. Дія комплексного препарату органічних сполук мікроелементів за різних способів його застосування на інтенсивність метаболічних процесів, антиоксидантний статус і репродуктивну функцію у кролиць .....	252
<b>РОЗДІЛ 4.....</b>	<b>269</b>
<b>АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>269</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>320</b>
<b>ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....</b>	<b>323</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>324</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>407</b>



## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

Mn	– Манган
Zn	– Цинк
Cr	–Хром
Se	– Селен
Ni	–Нікель
Cd	–Кадмій
Cu	–Купрум
DMEM	– середовище Ігла в модифікації Дульбекко
IVF	– запліднення поза організмом
IVM	– дозрівання поза організмом
АсАТ	–аспартатамінотрансфераза
АлАТ	–аланінамінотрансфераза
БСА	– бичачий сироватковий альбумін
ВМ	– важкі метали
ВООЗ	– Всесвітня Організація Охорони Здоров'я
ГП	– глутатіонпероксидаза
Г/л	–визначення лейкоцитів у системі СІ ( 10 <sup>9</sup> /л)
ГПЛ	– гідропероксиди ліпідів
ГСЖК	– гонадотропін сироватки крові жеребих кобил
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
кДНК	– комплементарна ДНК
ДМСО	– диметилсульфоксид
КС	–кондиційне середовище
ЛДГ	– лактатдегідрогеназа
ЛГ	– лютеїнізуючий гормон
ЛФ	– лужна фосфатаза
МДК	–максимально допустима концентрація

МТТ	– 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід
МЕ	– мікроелементи
МССІ	– англ. (meiotic sex chromosome inactivation) Мейотична інактивація статевих хромосом
МТ	–металотіонеїн
мРНК	– матрична РНК
МО	– міжнародна одиниця
ОКК	– ооцит-кумулюсні комплекси
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
ПЕГ	– поліетиленгліколь
ПСК	– плюрипотентні стовбурові клітини
ПОЛ	– пероксидне окиснення ліпідів
РНК	– рибонуклеїнова кислота
СОД	– супероксиддисмутаза
ТГ	– триацилгліцероли
ТБК	– тіобарбітурова кислота
Т/л	– вміст еритроцитів у системі СІ ( $10^{12}$ /л)
ТШ	– тепловий шок
ФСГ	– фолікулостимулюючий гормон
ФСТ	–ембріональна сироватка крові теляти
ХС	– холестерол
ХГЛ	–хоріонічний гонадотропін людини
ЦП	–церулоплазмін

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Ефективність ведення і рентабельність тваринництва визначається впровадженням сучасних методів репродуктивної біотехнології, які дозволяють істотно збільшити поголів'я, інтенсифікувати селекційний процес, розширити використання генетичного потенціалу високоцінних тварин, прискорити їх розмноження [14, 32, 95, 120, 241, 269]. Розробка та застосування біотехнологічних методів, що дозволяють підвищити заплідненість самок, отримати максимальну кількість здорового приплоду і зменшити ембріональні втрати, є необхідною умовою реалізації зазначених завдань.

Одним з чинників, який визначає успішність імплантації є якість ооцита, синхронність його ядерного і цитоплазматичного дозрівання, що позначається на подальшому розвитку та отриманні ембріонів з високим потенціалом розвитку [66, 377, 427]. Життєздатність ранніх ембріонів залежить від багатьох факторів, зокрема, активування ембріонального геному, зрілості та генетичного статусу, який визначається поєднанням материнського та батьківського геномів [337, 608].

До причин ембріональної смертності відносять епігенетичні процеси метилування ДНК, ремоделювання хроматину, фрагментацію ДНК сперматозоїдів, які допускають запліднення, але викликають ембріональну летальність на ранніх стадіях розвитку [418, 578]. Однак ці механізми порушення імплантації, за винятком генетичної складової, залишаються не з'ясованими і вимагають подальших досліджень.

Незважаючи на розвиток сучасних біотехнологічних методів відтворення тварин, існує необхідність вивчення як питань встановлення та посилення ембріонально-маткової взаємодії, раннього ембріогенезу, зумовленого впливом материнського і батьківського геному, так і розробкою методів активування імплантаційної та ембріональної здатності самиць.

Розвиток зигот і нормальний перебіг вагітності, у значній мірі, залежить від збалансованості гормонального фону в організмі матері та забезпеченні мікронутрієнтами [137, 188, 214, 234, 247]. Інтенсифікація відтворювальної здатності самиць передбачає використання біологічно активних речовин, різноманітних препаратів та біотехнологічних підходів, які сприяють посиленню ендокринного та метаболічного профілів організму й активуванню обмінних процесів у репродуктивних органах. Головна увага в даному напрямку приділяється проблематиці мікроелементозів при вагітності самиць [24, 39, 138, 198, 232], тоді як передімплантаційний підготовка залишається поза увагою, хоча саме цей період забезпечує оптимальні умови для дозрівання гамет, визначає успішність імплантації зиготи, стабільність ембріонального генома, розвитку плода.

Поряд зі значними досягненнями репродуктивної біотехнології, актуальним залишається завдання підвищення рівня запліднення та імплантації, що потребує комплексних підходів з урахуванням морфо-фізіологічних, генетичних факторів, а також підготовку організму самиці до вагітності.

Одним з підходів, який дозволяє швидко відпрацювати біотехнологічні методи, проводити скринінгові дослідження, з'ясувати клітинну відповідь на дію окремих чинників, є використання альтернативних досліджень *in vitro* [64, 219]. Водночас, важливою умовою для достовірного вивчення особливостей розвитку гамет і перебігу раннього ембріогенезу, встановлення закономірностей генетичних процесів у ссавців є проведення досліджень *in vivo*.

Проведення досліджень на модельних системах *in vitro* та *in vivo* дозволяє встановити розвиток порушень гаметогенезу ссавців на всіх ланках репродуктивної системи за умов дії екзогенних чинників та корегувати виявлені зміни, що було основним напрямком дисертаційної роботи.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**  
Дисертаційну роботу виконано у рамках завдань наукових досліджень

Інституту біології тварин НААН у період 2006-2015 рр. за темами: ДР 0106U003052 «Розробити методи стимуляції ембріонально-маткового сигналу у ссавців на основі вивчення механізму його становлення на ранніх стадіях вагітності», ДР 0111U006157 «Вивчити біологічні особливості зниження репродуктивної функції у сільськогосподарських тварин та розробити методи її інтенсифікації», ДР 0111U006154 «Розробити і впровадити методологію росту моношарів культур клітин маткового та ембріонального походження в системі збереження біологічного різноманіття тварин».

**Мета роботи** – розробка та застосування сучасних біотехнологічних підходів регуляції гаметогенезу модельних тварин задля підвищення репродуктивної функції самок, рівня запліднення, імплантаційної здатності та запобігання ранніх ембріональних втрат.

Для досягнення мети у роботі вирішували наступні *завдання*:

- оптимізувати окремі етапи пронуклеарної мікроін'єкції і надшвидкого кріоконсервування ембріонів ранніх стадій розвитку;
- визначити вплив культуральної системи репродуктивних клітин на морфологічні показники деконсервованих ембріонів;
- розробити об'ємну культуральну систему з використанням природніх і полімерних наноповерхонь і провести скринінг біосумісності цих нанопокриттів на різних типах культур клітин;
- вивчити вплив об'ємної клітинної системи, створеної на природних та полімерних наношарах, на дозрівання ооцитів і розвиток доімплантаційних ембріонів *in vitro*;
- оцінити вплив сполук різних металів на культурі клітин яйцепроводів та ембріональних фібробластах корів як тест-об'єкту для вивчення відтворювальної здатності самиць за дії факторів довкілля;
- з'ясувати вплив епігенетичних процесів на ранній ембріогенез, як складову чоловічого генетичного чинника, на прикладі аналізу паттерну

експресії генів у сім'яниках мишей за впливу локальної гіпертермії (42°C, 30 хв);

- дослідити вплив біогенних мікроелементів (Мангану, Цинку, Хрому) на заплідненість та імплантаційну здатність ембріонів самок лабораторних тварин;

- встановити залежність імплантаційного потенціалу і розвитку ембріонів від мінерального забезпечення самиць у прегравідарний період.

*Об'єкт дослідження:* регуляція гаметогенезу тварин ендо- та екзогенними чинниками для корекції раннього ембріонального розвитку у прегравідарний період.

*Предмет дослідження:* адаптивна відповідь клітин, гамет та функціонального стану репродуктивної системи організму тварин на дію різних стресових чинників, показники відтворювальної здатності, заплідненість, стан антиоксидантної системи та біотехнологія інноваційних препаратів для стимуляції відтворювальної здатності самок тварин.

*Методи дослідження:* культивування *in vitro* перещеплюваних культур клітин, первинних культур клітин репродуктивних органів, ооцитів та ембріонів, кріоконсервування зигот), мікроскопічні, генетичні (полімеразно ланцюгова реакція, клонування), біохімічні (визначення показників антиоксидантної системи, активності ензимів, вмісту ліпідів), гематологічні (визначення показників клінічного аналізу крові), а також статистичний аналіз одержаних результатів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Удосконалено окремі етапи твердоповерхневої вітрифікації зигот на стадії 2-ох пронуклеусів, оптимізовано технологію пронуклеарної мікроін'єкції, одержано приплід після трансплантації ін'єкованих зигот. Доведено перевагу використання клітинної культури репродуктивних органів самиць для культивування деконсервованих доімплантаційних ембріонів до стадії бластоцисти *in vitro*.

Експериментально доведено доцільність культивування клітин різних типів, дорощування та культивування ооцитів і зигот тварин поза організмом

до трансферабельних стадій на просторово-орієнтованих нанопокриттях, створених на матриці з біогелю природнього походження і нанопокритті з АПТЕС (3-амінопропіл(триетокси)силан), декстраном, альбуміном. Вперше встановлено, що модифікація нанопокриття полімерними наношарами декстрану, АПТЕС та альбуміну дозволяє наділити поверхню біологічно активними властивостями та отримати просторово-організовану клітинну систему, що покращує адгезію, стимулює їх ріст і проліферацію клітин. Створена 3D (тримірна) об'ємна клітинна система на носіях органічної та неорганічної природи здатна виконувати функції специфічного клітинного матриксу та сприяє моделюванню ембріонально-маткової взаємодії між клітинами ендометрію і бластомерами ембріона, що забезпечує стимуляцію і розвиток зигот поза організмом. Розроблено методи культивування моношарів культур клітин яйцепроводів на нанопокриттях різних типів зі створенням просторово-організованої клітинної системи для підвищення якості ембріонального матеріалу за використання їх у біотехнологічних дослідженнях.

Проведено системне дослідження особливостей гаметогенезу тварин за впливу екзогенних хімічних чинників (Cd, Ni, Cu, Zn, Mn, Cr) та фізичних природних факторів (гіпертермія) *in vitro* та *in vivo*.

Одержано нові дані про молекулярні механізми регуляції сперматогенезу за дії теплового шоку. Встановлено відмінність у відповіді на тепловий шок між соматичними і статевими клітинами та проаналізовано патерн експресії гена *Cideb*, пов'язаного з регуляцією апоптозу, (кодує одноіменний протеїн, який відповідає за регуляцію апоптозу) у тканинах миші за впливу локальної гіпертермії. Вперше виявлено альтернативний сплайсинг-варіант гена *Cideb* у сім'яниках за гіпертермії 42°C, що дозволило розширити уявлення про характер адаптивної відповіді організму, зокрема, репродуктивної функції самців, на дію стресових чинників.

Вперше вивчено вплив глутамату мангану та цинку, хрому метіоніну на культури клітин різних типів як тест-об'єктів для встановлення біохімічної

дії та оптимальної дози мікроелементів, з наступними їх впливом на відтворювальну здатність тварин та розробкою і створенням комплексного препарату з органічних сполук металів. Доведено доцільність та обґрунтованість застосування первинних органо-специфічних культур клітин репродуктивних органів для з'ясування безпосереднього впливу ксенобіотиків на репродуктивні клітини та прогнозування ступеню чутливості тканин і репродуктивної здатності тварин.

Уперше досліджено дію глютамату мангану і цинку у формі ліпосомальної емульсії у прегравідарний період. Виявлено доцільність використання цинку глютамату у період перед заплідненням, а в ранній ембріональний період - мангану глютамату.

**Практичне значення одержаних результатів.** З метою підвищення ефективності методів отримання ембріонів ссавців поза організмом пропонуємо за пронуклеарної мікроін'єкції використовувати культуральні системи клітин репродуктивних органів для дорощування зигот та відновлення деконсервованих ембріонів.

Розроблено та експериментально апробовано препарат “Ліпоорганік”, який поєднує у своєму складі фармакологічні властивості органічних і мінеральних біогенних мікроелементів у ліпосомальній формі. Препарат «Ліпоорганік» рекомендується до застосування з метою стимуляції відтворювальної здатності та запліднення самиць за 14 діб до осіменіння. Для посилення репродуктивної функції кролиць у ранній період сукрільності рекомендовано додавати препарат “Ліпоорганік” до складу гранульованого комбікорму за 14 діб до осіменінні, а також у поєднанні зі введенням препарату при осіменінні.

Для оптимізації умов дозрівання та культивування *in vitro* ооцитів та ембріонів рекомендовано застосовувати об'ємні клітинні системи маткового походження на основі нанопокриттів різних типів.



На підставі одержаних результатів розроблено методичні рекомендації «Отримання функціоналізованих наноповерхонь для культивування клітин, ооцит-кумулюсних комплексів та ембріонів тварин».

Розроблений алгоритм системного вивчення токсичності та/або біосумісності сполук металів на органоспецифічних первинних культурах клітин викладено у навчально-методичному посібнику “Клітинні культури і можливості їх використання в ембріональній біотехнології” (Рекомендовано Міністерством освіти і науки, спорту та молоді. Лист МОНмолодьспорту № 1/11 від 13.01.2012 року).

**Особистий внесок здобувача.** Автор самостійно обґрунтовано тему і концепцію дисертаційної роботи, проведено пошук та аналіз літератури, розроблено схему і методологію експериментальних досліджень, сформульовано основні положення дисертації, проведено статистичний аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено до друку публікації за темою роботи. Експерименти виконані дисертанткою особисто або за безпосередньої її участі. Формулювання основних положень, висновків і практичних рекомендацій виконано під керівництвом наукового консультанта д. б. н. Матвієнко Н. М. Планування роботи та обговорення частини отриманих результатів, підготовка деяких рукописів до публікації здійснювались спільно з доктором с.-г. наук Мадіч Аллою Всеволодівною. Синтез, ідентифікацію та характеристику наноповерхонь проведено у Національному університеті «Львівська політехніка» за участі доцента, к. хім. н. Стецишина Ю.Б.

У межах виконання гранту National Cancer Institute (NCI, Bethesda, USA) в Інституті онкології ім. Марії Склодовської-Кюрі (Польща) визначено тканиноспецифічну експресію генів і проведено окремі етапи пронуклеарної мікроін'єкції. Співучасть у роботі закордонних партнерів і співробітників лабораторії біотехнології відтворення Інституту біології тварин НААН вказано у спільних публікаціях.

**Апробація результатів дисертації** Результати досліджень, викладені у

дисертаційній роботі, доповідались на методичній і Вченій радах Інституту біології тварин НААН (2006-2016 рр.), а також були представлені на міжнародних та українських наукових конференціях і симпозіумах: «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 2012, 2014, 2016), XLV конгресі Польського біохімічного товариства (Wisla, 2010), XIVth Gliwice Scientific Meetings (Gliwice, Poland, 2010), VI Міжнародній конференції молодих вчених “Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція” (Одеса, 2013), Міжнародній конференції, приуроченій професору А. К. Тарковському «Mammalian Embryology Conference» (Warsaw, 2013), Міжнародній конференції «Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2013)» (Буковель, 2013), Національній науково-технічній інтернет-конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно-активних сполук та фармацевтичних препаратів» (Львів, 2013), IX Міжнародній науковій конференції da Rostim 2013 “Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно активні сполуки для сільського господарства, здоров’я людини і охорони навколишнього середовища” (Львів, 2013), 8-й Міжнародній конференції ECNP «Nanostructured Polymers and Nanocomposites» (Dresden, 2013), Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), 21-й Міжнародній конференції KRMIVA (Opatija Hrvatska, Croatia, 2014), 5-й Міжнародній конференції „Human–Nutrition–Environment” “Biotechnology for sustainable development” (Rzeszów, 2014), Міжнародному науковому симпозіумі “Modern animal husbandry – strategies, opportunities and performances” (Iasi, Romania, 2014), 9-й Міжнародній конференції “Structure and Stability of Biomacromolecules” (SSB 2015) (Kosice, Slovakia, 2015), XII Міжнародній конференції молодих вчених „Physiology and Biochemistry in Animal Nutrition” (Łowicz, Poland, 2015), Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини», присвяченій 55-річчю Інституту біології тварин НААН (Львів, 2015), 20-му Міжнародному симпозіумі «Housing and Diseases

of Rabbits, Furproviding Animals and Pet Animals» (Celle, German, 2017), V Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2017), XXIV симпозиумі по імунології та репродукції з міжнародною участю (The Castle, Trest, Czech Republic, 2018).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 53 наукові праці, у тому числі 1 монографія, 22 статті (18 – у наукових фахових виданнях України з біологічних наук та 4 – у виданнях іноземних держав, які включені до міжнародних наукометричних баз даних), 3 праці у інших виданнях, 5 патентів на корисну модель, 22 тези доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, опису результатів власних досліджень, їх аналізу та обговорення, висновків, списку використаної літератури (691 найменувань, в тому числі 421 латиницею) і додатків (13). Дисертацію викладено на 406 сторінках комп'ютерного тексту, її основна частина становить 292 сторінки. Робота ілюстрована 99 таблицями і 49 рисунками, з яких 6 повністю займають площу сторінки.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Застосування біотехнологічних методів у тваринництві

Репродуктивні технології широко використовують для збереження біорізноманіття різних видів тварин, зокрема, зникаючих порід та прискорення генетичного прогресу у тваринництві. Сучасний комплекс репродуктивної біотехнології включає дозрівання *in vitro* гамет та ембріонів, трансплантацію зигот та ембріонів різних стадій розвитку, використання сексованих спермій, інтрацитоплазматичну ін'єкцію спермія у яйцеклітину (ІКСІ), штучне запліднення, кріоконсервування репродуктивних клітин та ембріонів, клонування та трансгенез [3, 24, 32, 66, 78, 95, 117, 304, 377, 440, 562]. Проте, незважаючи на усі досягнення у цій галузі, необхідність удосконалення біотехнологічного процесу отримання гамет та ембріонів з високим біопотенціалом залишається актуальною.

Отримати *in vitro* ембріони лабораторних тварин можна лише після забою тварин чи хірургічно з приантральних і антральних фолікулів самок. Для отримання гамет сільськогосподарських тварин розроблено методи, які широко застосовуються для вилучення ооцитів лапароскопічно шляхом аспірації фолікулів яєчника (ovum pick-up – OPU) після гормональної стимуляції. За даними літератури, при штучному осіменінні отримують одне теля, при суперовуляції та заплідненні *in vitro* – до 12 за рік, а при використанні OPU-технології та заплідненні ооцитів поза організмом – від 52 до 104 [643]. При цьому за одну процедуру вимивання після індукції поліовуляції від однієї корови-донора отримують до 7-10 ооцитів на стадії метафази II, з яких 5 розвиваються до трансферабельних стадій, тоді як з яєчник корови можна аспірувати до 200 фолікулярних ооцитів.

Удосконалення інноваційних технологій репродуктивної біології потребує значної кількості біологічного матеріалу, тому реальною

альтернативою є відбір яйцеклітин з наступним їх запліднення *in vitro* та дорощування ембріонів поза організмом до доїмплантаційних стадій.

Статеві клітини людини та різних видів тварин проходять складний тривалий багатостадійний процес диференціації, який забезпечує розвиток гамет, а також внаслідок неодноразової рекомбінації хромосом між дочірніми клітинами у 1-му та 2-му поділі мейозу, забезпечує у геномі кожної статевої клітини формування унікального набору хромосом від геномів батьків, що підвищує життєздатність та пристосування до змін навколишнього середовища нового організму.

Як відомо, кількість примордіальних фолікулів формується антенатально і залежить від величини початкового яйникового резерву, який неухильно зменшується впродовж життя як у результаті овуляції, так і атрезії фолікулярного епітелію [393] чи трансформації у гормонопродукуючі структури (жовті тіла) [108]. До прикладу, у 4-місячного плоду людини оваріальний резерв становить 2–4 млн [65] або до 7 млн ооцитів на стадії диплотени профазі I мейозу у примордіальних фолікулах [394]. Згідно даних, при народженні у плода фіксується біля 1 млн фолікулів, і на період менархе їх кількість сягає 250000 – 470000 [30, 647], а протягом життя утворюється близько 400 зрілих ооцитів (за деякими даними – 300-500).

Після декількох мітотичних поділів в оогоніях відбувається конденсація хромосом, їх деконденсація, остаточний синтез ДНК [64] та трансформація ПК у первинний ооцит на стадії лептотени профазі I мейозу. На відміну від профазі мітозу профаза I мейозу – тривалий процес, який складається з прелептотени, лептотени, зиготени, пахітени, диплотени, диктіотени [109]. Подальший розвиток включає кон'югацію гомологічних батьківських хромосом на стадії зиготени профазі I мейозу та кросинговер на стадії пахітени профазі I мейозу. У анафазі I починається розбіжність гомологічних хромосом до протилежних полюсів, а цілковита сегрегація рекомбінатних алелей проходить в анафазі II при розходженні сестринських хроматид [108] до різних полюсів клітини і формуванням двох дочірніх

клітин з гаплоїдним набором хромосом, що містять гени обох батьків. Встановлено, що формування фолікулів в яєчниках ембріонів та плодів людини і ссавців проходить навколо ооцитів на стадії диплотени профазі I мейозу. У примордіальних фолікулах ссавців ооцити переходять із стадії диплотени у стадію диктиотени, яка характеризується ниткоподібною зміною хромосом та високою транскрипційною активністю ооцитів. Більшість синтезованих білків та РНК ооциту в подальшому використовуватиметься після запліднення при формуванні зиготи та у період раннього розвитку ембріону.

Вплив фізичних та хімічних факторів у певні періоди вагітності можуть спричинити порушення процесів мітозу при екстрафолікулярному розвитку статевих клітин, знизити резерв гамет в організмі та індукувати формування гамет з генетичними та хромосомними мутаціями при збереженні життєздатності, що уможливорює їх участь у заплідненні. Зазвичай, найменша кількість дегенерованих гамет знаходиться на стадіях зиготени та пахітени, потім – диплотени профазі I мейозу, що зумовлено найвищою активністю репараційних процесів, які відновлюють пошкодження отримані при кон'югації та кросинговері, що є характерним для даних стадій диференціювання/розвитку гамет [25]. Зокрема, введення під час вагітності мишам та щурам окситетрацикліна, алкоголю, нікотину та 17- $\beta$ -естрадіолу призводить до зниження резерву статевих клітин у нащадків 1-го покоління, крім того виявлено зниження кількості овулюючих яйцеклітин у статевозрілих нащадках мишей, матерям яких при вагітності вводили окситетрациклін у терапевтичній дозі. Виявлено вплив нікотину на нез'єднання хромосом впродовж дозрівання ооцитів [491], затримку росту ембріонів [627], зниження кількості життєздатних ооцитів [233, 628].

Мейотичне дозрівання ооцитів є найважливішим етапом, який визначає подальший потенціал ооцита до запліднення та розвитку ембріону. Деякі питання регуляції механізмів мейозу досі залишаються нез'ясованими. Нині вихід ооцитів на стадії метафази II поза організмом залишається набагато

нижчим, ніж за їх отримання *in vivo* [340]. Виявлені відмінності у рівні дозріванні ооцитів поза організмом та за умов *in vivo*. Зокрема, встановлено асинхронність ядерного та цитоплазматичного дозрівання яйцеклітин при їх культивуванні *in vitro* [66, 427]. Ооцити преовуляторних фолікулів людини, корови та миші характеризуються формуванням хромосомно-ядерного апарату – каріосфери, яка забезпечує зберігання факторів дозрівання попередників мРНК. Цей комплекс ядерних ультраструктур: ядерця, конденсованих хромосом, ядерцевоподібних тілець (ЯПТ), кластерів інтерхроматинових гранул дозволяє після запліднення передавати накопичену РНК від зиготи до ембріону [68, 157].

Першою морфологічною ознакою дозрівання ядра ооцита є руйнування зародкового міхурця-ядра. Після цього спостерігається конденсація диплотенних хромосом, симетричне розміщення бівалентів та їх розходження і перехід у стадію профазі першого мейотичного поділу. На цій стадії поділу мейотичне дозрівання блокується до запліднення ооцита.

Дозрівання ооцитів супроводжується також морфологічними, біохімічними та фізіологічними змінами у цитоплазмі, які визначають їх здатність до запліднення та подальшого розвитку. Однією з причин низької запліднювальної здатності ооцитів отриманих *in vitro*, є завершення дозрівання ядра без повноцінного цитоплазматичного дозрівання. Культивування ОКК овець у присутності гонадотропінів та естрадіолу сприяє підвищенню запліднення ооцитів *in vitro* та їх подальшому розвитку до стадії бластоцисти [117]. До цитоплазматичних аномалій належить підвищена грануляція та вакуолізація цитоплазми, наявність рефрактерних тілець та аномальних агрегатів у ендоплазматичному ретикулумі. Виявлення цих структур вказує на цитоплазматичну незрілість клітин, що призводить до порушення подальшого дозрівання ооцита та ембріонального розвитку. Також встановлено більш низьку частоту імплантацій при трансплантації ембріонів, які розвинулись з ооцитів зі збільшеним перивителіновим простором та грануляцією [378].

Важливу роль у прояві ооцитами компетенції до повноцінного дозрівання відіграють фолікулярні соматичні клітини, які за рахунок активації різних сигнальних шляхів безпосередньо впливають на транскрипційну активність, регулюють мейоз, впливають на ядерне та цитоплазматичне дозрівання ооцита [308, 339]. Як відомо, клітини кумулюсу беруть участь у підтриманні нормальних процесів дозрівання, овуляції та заплідненні ооцитів ссавців [630].

Особливо актуальним завданням репродуктивної біотехнології залишається отримання достатньої кількості якісних ооцитів і ембріонів та розробка критеріїв оцінки морфологічної якості та хромосомних патологій гамет, які б дозволили відібрати зиготи з високим потенціалом розвитку та імплантації.

Дослідження останніх десятиліть доводять можливість оцінки ооцитів за станом клітин, які їх оточують, оскільки це виключає ризик пошкодження ембріонів, який має місце при проведенні молекулярно цитогенетичних методів, зокрема, порівняльної геномної гібридизації. Реакція кумулюсних клітин на різноманітний вплив навколишнього середовища, завдяки тісній взаємодії та взаємодоповнюючому впливу клітин кумулюсу та ооцита, достовірно відображає стан самого ооцита. Так, аналіз експресії генів у кумулюсних клітинах дозволяє з'ясувати якість ооцита, визначити його здатність до подальшого дозрівання, успішного запліднення та ембріонального розвитку [316, 658].

У процесі фолікулогенезу глюкоза відіграє ключову роль у підтримці нормального розвитку ооцита, продукції енергії, синтезу нуклеїнових кислот та пуринів, підтримці гомеостазу клітин, однак, сам ооцит не здатний використовувати цей метаболіт [625]. Кумулюсні клітини через спеціалізовані трансзональні цитоплазматичні виступи, які проходять через зону пелюциду, формують контакти з ооцитом [187], за допомогою яких проходить метаболічний обмін та транспорт сигнальних молекул [323]. Клітини кумулюсу метаболізують більшу частину глюкози шляхом гліколізу



та доставляють через щільні контакти проміжні продукти метаболізму в ооцит [640]. Ці клітини здатні виробляти такі антиоксиданти, як супероксиддисмутаза (СОД), які захищають ооцит від АФК-індукованого ушкодження [504]. У процесі експансії клітини кумулюсу продукують гіалуронову кислоту, яка необхідна для нормального розвитку ооциту, овуляції та запліднення [495, 586]. Kimura N. виявив кореляційний зв'язок між рівнем HAS2 (гіалуронансинтетаза 2) та синтезом гіалуронової кислоти, а також ступенем експансії клітин кумулюсу [447]. Встановлено, що рівень експресії мРНК гену HAS2 у кумулюсних клітинах ооцитів, які розвинулися до ембріонів високої якості на 3-тю добу, був у 6 разів вищим порівняно з ембріонами низької якості [508].

Важливу роль синтезу простагландинів для активації процесів овуляції та експансії клітин кумулюсу доведено дослідженнями Ochsner та ін., які показали, що зниження рівня експресії гену PTGS2 у клітинах кумулюсу призводить до пригнічення овуляції та безпліддя [534]. Простагландин E2 (PGE2) активує синтез та секрецію гіалуронової кислоти кумулюсними клітинами за рахунок впливу на простагландинові рецептори (PTGER2 та PTGER3), які експресуються у кумулюсі при дозріванні фолікулів до овуляції [403].

Однією з важливих функцій клітин кумулюсу є підтримка блоку мейозу в ооциті через регуляцію надходження циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ), який перешкоджає гідролізу циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ), утримуючи таким способом високу концентрацію цАМФ в ооциті, що блокує мейотичний поділ. Викид ЛГ, який передуює овуляції, запускає каскад реакцій, які сприяють надходженню цГМФ з клітин кумулюсу до ооциту [484, 532].

Ооцити ссавців, отримані з антральних фолікулів для відновлення мейозу, потребують введенням гонадотропінів. Рецептори ЛГ локалізовані у клітинах гранульози, теки та клітинах кумулюсу, але не в ооциті [681]. Дослідження, проведені на мишах, свинях, коровах, довели, що активація ЛГ

рецепторів регулюється епідермально-подібним фактором росту, амфірегуліном (AREG), епірегуліном (EREG) та бетацелуліном (BTC), які синтезуються клітинами гранульози та сприяють передачі ЛГ сигналу до ооцита [79]. Ключову роль у дозріванні ооциту відіграють саме клітини гранульози. Ці соматичні клітини фолікула секретують інгібітор дозрівання ооцитів (OMI oocyte maturation inhibitor) – натрійуретичний петид С-типу, який блокує мейоз [683]. За дії ЛГ секреція даного пептиду інгібується і ооцит відновлює мейотичний поділ. Це відповідно підвищує рівень експресії мРНК гену простагландин-синтази 2 (PTGS2) у клітинах кумулюсу, що сприяє дозріванню ооцита [496, 583]. Ооцити продукують фактори росту, які регулюють диференціацію, проліферацію, апоптоз і лютеїзацію гранульозних та кумулюсних клітин.

При вилученні ооцита із фолікула зв'язки з фолікулярними клітинами порушуються, а тому при культивуванні ОКК *in vitro* особливого значення набуває створення максимально наближених умов *in vivo*. Повноцінне дозрівання цитоплазми ооцитів визначає подальший розвиток, компетентність до запліднення, здатність до ембріонального розвитку до періоду нідації ембріону [338]. Завершення ядерного дозрівання ооцита характеризує виділення першого полярного тільца, при цьому проходить блокування мейозу на стадії метафази II. Теоретично такі ооцити здатні запліднитися, однак незавершеність цитоплазматичного дозрівання через дефіцит деяких факторів росту, призводить до зупинки ембріонального розвитку [418].

На стадії профазі мейозу в ооцитах інтенсивно проходить синтез мРНК та рРНК, білків, які накопичуються у цитоплазмі впродовж оогенезу та використовуються на перших стадіях ембріонального поділу, оскільки ембріональний геном ще не активований. Вміст РНК в ооцитах корів при дозріванні до метафази II *in vitro* на 20% нижчий, у порівнянні з ооцитами, отриманими з яйцепроводів корів після спонтанної овуляції. Активація ембріонального геному відбувається на стадії 8-16 бластомерів у корів, овець,

кіз та коней та 4-х еластомерів у свиней [79]. Згідно з даними Plachot M., Crozet N., 1992 [549], у 33,9 % ооцитів, отриманих у програмі ЕКЗ, спостерігаються морфологічні ознаки незрілості. Доведено, що стан цитоплазми ооцита на момент запліднення визначає поведінку спермія, зокрема визначає темп утворення пронуклеусі, швидкість конденсації хромосом. Повноцінність цитоплазматичного дозрівання ооцита характеризує здатність до формування пронуклеусів після запліднення та нормальний перебіг доімплантаційного ембріонального розвитку [120, 154].

За відсутності необхідних умов культивування ооцитів *in vitro* сповільнюються темпи розвитку ембріонів, змінюється рівень експресії деяких регуляторних факторів [686], порушується експресія імпрітингових генів, знижується кількість життєздатних ембріонів [672]. У результаті перезрівання ядерного матеріалу при тривалому культивуванні ооцитів рівень хромосомних порушень зростає [79], тоді як запліднення недостатньо дозрілого ооцита може призвести до затримки деконденсації спермального хроматину і поліспермії або викликати неспроможність зиготи до запліднення. Тому при моделюванні оптимальних умов культивування необхідно також враховувати видові особливості часових параметрів культивування ОКК. Так, яйцеклітини корів та овець досягають зрілості через 24 год після культивування, свиней – через 40-48 год, а у коней та кіз оптимальним часом дозрівання ооцитів є 24-30 год [487].

У період доімплантаційного розвитку ембріонів відбуваються значні фізіологічні та метаболічні зміни ембріона – перехід від материнського до ембріонального контролю, що призводить до зниження транскрипційної та трансляційної активності, уповільнення метаболізму ембріонів [120, 271]. Саме період експресії гену є причиною блоку розвитку ембріонів поза організмом. У ембріонів людини він спостерігається на стадії 8-ми клітин, у мишей – 2-ох клітин, у великої рогатої худоби ембріональний розвиток блокується на 8-16 клітинній стадії, а у ембріонів свині на стадії 4-8 клітин [162, 463]. Співкультивування доімплантаційних ембріонів на моношарі

клітин фолікулярного і маткового походження сприяє подоланню ембріонального блоку, стимулює розвитку ембріонів *in vitro* [122, 268]. Клітини кумулюсу і гранульози забезпечують яйцеклітини поживними речовинами, ростовими факторами, амінокислотами [415], які беруть участь у вуглеводневому обміні, регулюванні осмотичного тиску, осмолярності та pH клітин [477]. Згідно результатів Пертушко М. П., культивування ембріонів людини на моношарі як свіжовиділених, так і кріоконсервованих клітин кумулюсу та гранульози сприяє збільшенню розвитку ембріонів до стадії бластоцисти та забезпечує високі морфологічні показники внутрішньоклітинної маси та трофоектодерми [162]. За даними D. Khan та співавт. [442], клітини кумулюсу утворюють цитоплазматичні містки, які забезпечують обмін низькомолекулярними речовинами між зародком та клітинами, а клітини гранульози секретують у середовище культивування амінокислоти і фактори росту, що стимулює розвиток ембріонів [509]. Замінні амінокислоти (серін, аргінін, пролін, орнітин та глютамін) прискорюють поділ внутрішньої клітинної маси і підвищують здатність ембріона до розвитку після імплантації [416]. Незамінні амінокислоти (метіонін, валін, лейцин та триптофан) сприяють розвитку ембріона від зиготи до бластоцисти, зокрема збільшують кількість клітин трофобласта та підвищують здатність бластоцисти до вилуплення [162]. З огляду на це, використання клітинних фідерних культур при культивуванні ОКК та ембріонів поза організмом дозволить відтворювати умови оточення *in vivo* для забезпечення їх виживання, проліферації та диференціації шляхом постачання клітинам поживних та регуляторних речовин. Крім того, вища частота впливу різних хімічних та фізичних чинників *in vitro* порівняно до природніх умов, спричиняє дестабілізацію мейотичного блоку ооцитів, утворенню зигот з одним пронуклеусом, розвитком гаплоїдних ембріонів [32, 419].

Більшість методів репродуктивної біотехнології передбачає короткотривале культивування ембріонів у синтетичних середовищах перед

трансплантацією у репродуктивні органи матері [609]. Середовище, яке створює фідерний моношар, одержаний з фолікулів клітин репродуктивних органів самок, максимально відтворює природне середовище, в якому розвиваються зародки. Фідерний клітинний моношар, який відіграє роль підтримуючого клітинного матриксу здатен моделювати *in vitro* оточення ефективніше, ніж звичайне кондиційне середовище або його синтетичні аналоги. Так, навіть впродовж 6-ти діб культивування поза організмом на підтримуючому живильному моношарі епітеліальних клітин ендометрію без додавання сироватки, бластоцисти мишей зберігали високу життєздатність [121]. Отримано кращі результати розвитку бластоцист людини при ко-культивуванні з клітинами ендометрію у порівнянні з культивуванням у комерційно спеціалізованих середовищах типу G2.3 [302]. Позитивний вплив клітин ендометрію на розвиток ембріонів обумовлений секрецією клітинами сигнальних молекул – ембріотропних факторів, цитокінів (LIF, IL-6, IL-11), факторів росту (TGF, HB-EGF, IGF), металотіонеїнів, які здатні елімінувати продукти метаболізму, вільні радикали, важкі метали [3, 363]. Результати досліджень Mercader et al. підтвердили, що ко-культивування ембріонів з ендометріальними епітеліальними клітинами на 50,8 і 58,2% підвищує формування бластоцист та рівень імплантації відповідно [512]. Тому спроби мінімізувати ембріональні втрати активуванням розвитку ембріонів шляхом їх культивування, зумовили використання культури епітеліальних клітин яйцепроводів, клітин гранульози та кумулюсу [163, 415, 568].

Сучасні методики дозрівання ембріонів базуються на культивуванні у моношаровій системі, яка на відміну від трьохвимірного оточення в тканинах організму, не забезпечує природнього мікрооточення, що призводить до зміни форми та функціональної здатності клітин [660]. Важливе значення для розвитку гамет та ембріонів в умовах *in vitro* має трьохвимірною системою клітин, яка за допомогою міжклітинних контактів і просторовій цитоскелетній організації клітин сприяє створенню тканиноподібних клітинних структур [279, 367].

Інтенсивно розвиваються дослідження з вивчення клітинної сигналізації, проліферативного росту і міграції клітин у культурі в умовах 3D з використанням об'ємних клітинних культур на основі різних речовин (фібрин, водорості, синтетичні пептиди, нанорешітка з діоксиду титану тощо) [368, 531, 687]. Хімічний та фазовий склад поверхні, її топографія – головні фактори, які регулюють ріст клітин та їх функції [57, 229, 528], модулюють адгезивний потенціал клітин [50, 461]. На прикладі культивування фібробластів та макрофагів на матричних покриттях встановлено залежність адгезивного потенціалу клітин від рельєфу поверхневого шару біоматеріалу. Так, мікротопографія покриття поверхні до 1-2 мкм сприяє кращій адгезії та формуванню клітинами актинових, тубулінових, виментинових та винкулінових волокон фібробластів, у порівнянні з гладкою чи більш грубою поверхнею (4-8 мкм) [277]. Важливою характеристикою є поверхнева енергія покриття, її дисперсність та полярна складова: високі показники поверхневої енергії та фракційної полярності покриття стимулювали проліферацію клітин [691]. Мобілізація на поверхні біопокриття хімічно активних груп, зокрема, OH- та NH<sub>2</sub>-груп за рахунок їх взаємодії з трансмембранними білками клітин – інтегринами, модулює генну експресію в остеобластах, активує ферментатичну активність лужної фосфатази, сприяє мінералізації матриксу [51].

Детально досліджено чимало факторів, здатних забезпечити клітинну адгезію. Наприклад, білки та глікопротеїни позаклітинного матриксу, такі як колаген, ламін, фібронектин, вітронектин, а також синтетичні макромолекули, зокрема, полі-L-лізин [577, 585]. Доведено успішність застосування нанокомпозитних покриттів на основі титану та його сплавів, рутенію, ніобію, окидів металів, полімерів для модифікації поверхні та культивування клітин різних типів [277, 345, 632].

Актуальною є розробка композитних матеріалів, які поєднують синтетичні та природні полімери [51, 62, 125]. Створення багатошарових матеріалів, в яких структура та механічні характеристики формуються

синтетичними матеріалами, а біологічна активність визначається макромолекулами білків, полісахаридів та іншими активними компонентами забезпечує високу адгезивність субстратзалежних клітин, їх життєздатність та проліферацію [182].

Отож, модифікації структурно-конформаційних, фізичних та хімічних властивостей покриття забезпечують функціональну властивість, адгезію, диференціацію та визначають ріст клітин *in vitro*, що відкриває перспективи розвитку методів тканинної інженерії та клітинної біотехнології на основі використання наноматеріалів та створення трьохвимірних систем.

З огляду на це, комплексні дослідження зі створення методології одержання культур клітин ембріонального та маткового походження на основі нанопокриттів різних типів є актуальними, а вивчення участі у цих процесах міжклітинних взаємодій дозволить створити комплексну просторово організовану клітинну систему, яка не лише забезпечить повноцінне дозрівання гамет та ембріонів, але й стане моделлю у вивченні механізмів раннього ембріонального розвитку у ссавців [94].

## **1.2. Епігенетична регуляція геному**

Регуляція експресії генів є результатом комплексних процесів, які включають активацію одних генів та підтримання інших у стані мовчання (сайленсинг). Механізм епігенетичної регуляції передбачає репресію генів на основі локальних змін структурно функціональної організації хроматину, що обмежує доступність транскрипційних факторів до нуклеосомної ДНК. Епігенетичний статус визначається характером та рівнем метилування ДНК, посттрансляційними модифікаціями гістонів, характером упакування хроматину.

Концепція Уодінгтона, який вперше запровадив ідею участі метилування у регуляції генів, пояснювала процес диференціації клітин в організмі, виходячи із припущення, що кожна клітина є тотипотентна, а

подальша диференціація клітини – це реакція на отримання певних гормональних та інших біологічних сигналів, які активують різні групи генів (генна експресія). Такі процеси були віднесені до епігенетичних.

Статеві клітини володіють унікальною здатністю передачі генетичної інформації через механізми генетичної та епігенетичної регуляції. Передача епігенетичної інформації проходить без зміни нуклеотидної послідовності ДНК шляхом зміни генетичної активності в онтогенезі функцій ДНК, хроматину, протеїнових комплексів, асоційованих з ДНК. На відміну від мутацій змінюється активність, а не структура генетичного матеріалу, а від модифікацій тим, що зміни генетичної активності успадковуються наступними поколіннями [109].

Головною особливістю спеціалізації ранніх попередників статевих клітин – примордіальних статевих клітин (ПСК), які походять від клітин екстраембріональних ліній і відособлюються у результаті отримання від них сигнальних молекул, є репресія в них соматичної програми розвитку. У статевих клітинах та доімплантаційних ембріонах ссавців проходить два цикли деметилування/реметилування шляхом широкого геномного репрограмування у результаті якого утворюються клітини з різним диференційним потенціалом.

До найважливіших тригерів, які призводять до порушення епігенезу, належать харчування, екополютанти, інфекції, паління тютюну, алкоголь, стресові чинники. Вплив факторів навколишнього середовища може призвести до міжособового фенотипічного різноманіття, а також до диференціальної чутливості до ксенобіотиків. Особливо чутливі до екологічних факторів типи генів, експресія яких регулюється епігенетичними механізмами, як-от імпринтингові гени та метастабільні епіалелі [160]. Епігенетичний статус метастабільних алелей визначається в ембріогенезі за принципом випадковості, детермінуючи їх домінантність. Період ембріонального розвитку організму є найбільш вразливий до впливу екотоксикантів, оскільки ембріогенез характеризується високою швидкістю



синтезу ДНК та саме в цей відрізок часу проходить встановлення патерну метилування ДНК [362]. Негативний вплив факторів довкілля чи дієти в цей період можуть призвести до порушення епігенезу зародків, аномалій росту та розвитку.

**1.2.1. Епігенетичні модифікації в гамето- та ембріогенезі за впливу екопатологічних чинників.** Епігеном забезпечує важливий взаємозв'язок між генами і навколишнім середовищем, залишаючись найбільш чутливим до дії зовнішніх впливів, особливо, за гамето- та ембріогенезу. Під час гаметогенезу та раннього ембріогенезу епігеном перепрограмується і, у цей період, первинні статеві клітини, статеві клітини та ранні зародки особливо сприятливі до зовнішніх чинників. У процесі розвитку ссавців ДНК деметилується під час доімплантаційного розвитку, а потім піддається реметилуванню, однак не дивлячись на це, встановлено, що патерн метилування ДНК може передаватися між поколіннями. Однак, точні механізми залишаються не з'ясованими.

Вплив екологічних чинників, зокрема деяких сполук металів безпосередньо пов'язане з аберантними змінами епігенетичної регуляції. Якщо на початку впливу епігенетичні зміни є незначними і мають адаптатичний характер, то тривала дія призводить до розвитку захворювань різної етіології. Епігенетична регуляція притаманна нормальному розвитку та диференціюванню, тому відхилення від нормального процесу призводить до розвитку серйозних захворювань. Пренатальний чи ранній вплив факторів середовища можуть мати визначальний вплив на епігеном особи, що проявляється вродженими дефектами і захворюваннями, які проявляються в подальшому житті. Тому з'ясування причинно-наслідкового зв'язку між чинниками середовища і епігенетичними змінами дозволить запобігти виникненню фетальних захворювань у дорослому віці, включаючи ініціацію раку, неврологічних захворювань та метаболічний синдром. [298].

Кадмій негативно впливає на чоловічу і жіночу репродуктивну функцію. Залежно від дози, він здатен посилювати чи інгібувати біосинтез прогестерону,

впливаючи на морфологію яєчників [408]. За хронічного поступлення низьких доз Кадмію спостерігають зменшення кількості сперматогоніїв та мейотичних клітин, що зумовлено порушенням структури та функції протеїнів, які беруть участь у кон'югації хромосом та мейотичній рекомбінації [388]. Встановлено, що Кадмій накопичується в ембріонах, починаючи зі стадії чотирьох клітин, та в залежності від дози викликає пошкодження ДНК, зупинку клітинного циклу та окислювальний стрес [307, 556]. Навіть у низьких дозах (1 мкмоль) Кадмій впливає на гаметогенез у людей, зменшуючи кількість зародкових клітин в яєчниках і сім'яниках плода та посилюючи апоптоз [280].

Однією з основних причин канцерогенезу, викликаного ВМ є їх вплив на взаємодію між ДНК та ДНК-метилтрансферазами, що призводить до зміни глобального метилування ДНК в проонкогенах та порушення систем репарації ДНК [290, 414]. З огляду на те, що у ранньому ембріогенезі проходить перепрограмування геному через зміну рівня метилування ДНК, вплив зовнішніх чинників може позначитися на процесі встановлення епігенетичного маркування всього геному або окремих генів. Таке аномальне маркування може вплинути на схильність до різних патологій в подальшому, коли активуються відповідні гени [400, 502]. Доведено, що ефект Кадмію на епігенетичну модифікацію зумовлений змінами патерну метилування ДНК. Вплив низьких доз Кадмію інгібує ДНК-метилтрансферазну активність і викликає гіпометилування ДНК, тоді як тривала дія цих доз підвищує ДНК-метилтрансферазну активність і гіперметилування ДНК [627].

Епігенетичні модифікації за токсичної дії Нікелю включає зміну експресії генів через гіперметилування ДНК і гіпоацетилювання гістонів [498], а також активування чи пригнічення деяких генів і факторів транскрипції, зокрема тих, які задіяні у клітинній відповіді на гіпоксію [380]. Порівнюючи з  $Mg^{+2}$  Нікель сприяє конденсації хроматину [370], внаслідок метилування ДНК та змінами експресії генів. Епігенетичні ефекти Нікелю, що викликали зміну посттрансляційної модифікації гістонів, спостерігались у людей, що піддавались тривалому впливу цього елементу з екологічних або

професійних причин. Нікель знижує клітинний рівень S-аденозилметіоніну, тим самим зменшуючи активність ДНК-метилтрансфери і загальний рівень метилювання. Нікель також викликає гіперметилювання промоторів окремих генів.

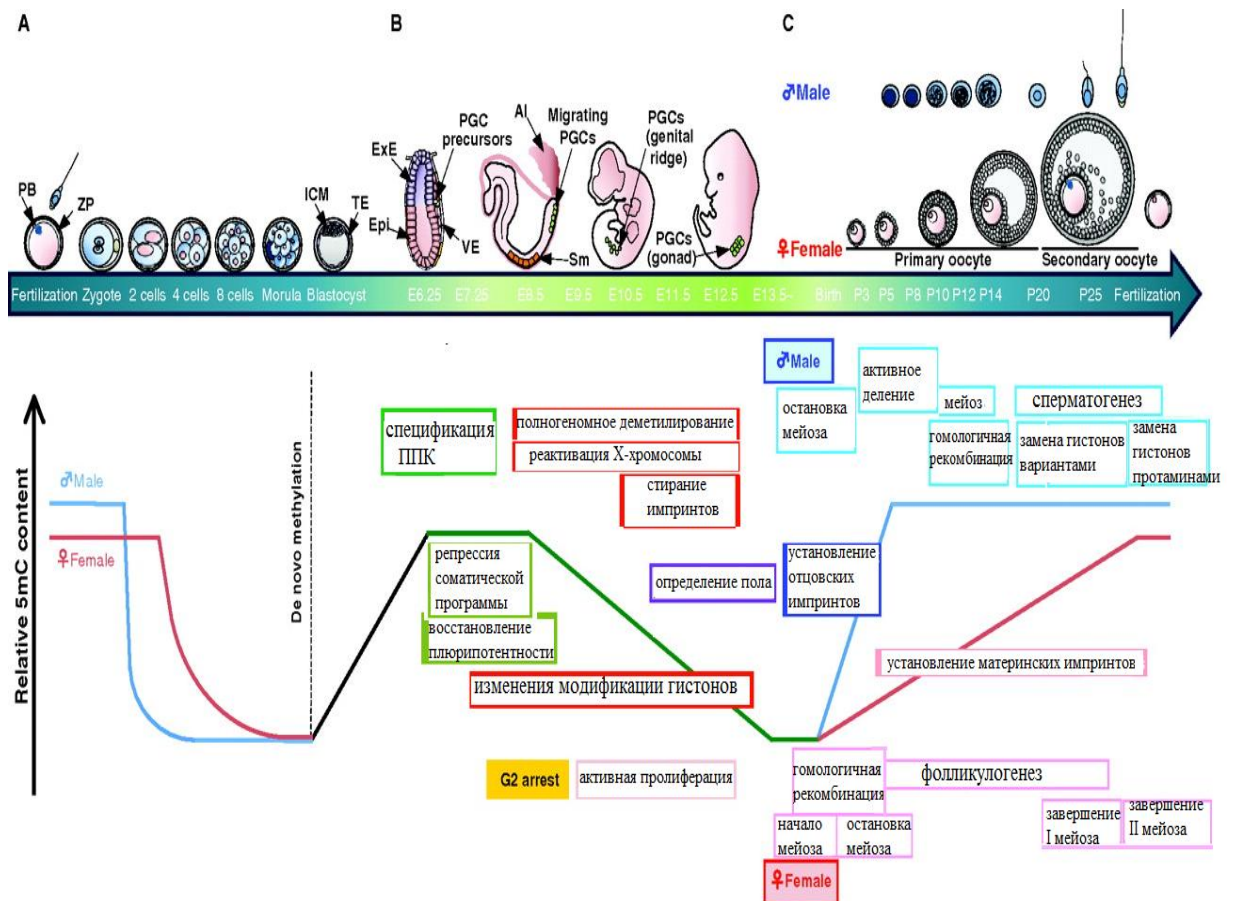
Отже, з'ясування впливу металів на модифікацію епігенетичних маркерів, їх взаємодію у хроматині, зміну патерну генної експресії вимагає подальших досліджень, особливо враховуючи здатність металів впливати на клітинні процеси, включаючи структуру хроматину, утворення активних форм кисню.

Влив екзогенних чинників на статеві клітини на певній стадії розвитку є критичним для формування спадкових епігенетичних змін. Оскільки епігенетичні механізми зумовлені впливом екологічних факторів за ембріогенезу, то можуть впливати на подальше здоров'я. Епігенетична модифікація геному, окремих генів, позагеномних послідовностей і повторів можуть модулюватися різними факторами середовища, зокрема хімічними речовинами, металами, дієтою. Гіпотеза «ембріональної основи або раннього походження» дорослих захворювань передбачає, що харчування та інші чинники навколишнього середовища під час вагітності та раннього розвитку впливають на клітинну пластичність, що зумовлює схильність до серцево-судинних хвороб, діабету другого типу, ожирінню та інших захворювань у дорослому віці.

Епігенетична модифікація без змін послідовності ДНК (метилювання) транскрипційно інактивує хроматин, що зумовлено надмолекулярними змінами його компактизації. Метилювання ДНК контролює всі біологічні процеси: ріст та розвиток організму, транскрипцію, реплікацію та репарацію ДНК, клітинну диференціацію, структуру хроматину та тканиноспецифічну експресію, відповідає за інактивацію X-хромосоми, геномний імпринтинг та ембріогенез. Відомо, що регуляторні елементи геному (промотори, енхансери, ізолятори, репресори) метилуються задля супресії їхньої функції. Метилювання ДНК в геномі є специфічною формою клітинної пам'яті –

універсальний та зворотній механізм, що створює генетичне різноманіття. Різні клітини організму, об'єднані єдиним геном, мають різні епігеноми, що забезпечує диференційну експресію генів, різні клітинні фенотипи та функції.

Метилування ДНК у клітинах організму різне за просторовою, часовою і тканинною специфічністю [562].



**Рис. 1.1. Схема передімплантаційного розвитку миші та динаміка метилування ДНК статевих клітин під час раннього розвитку ембріона [570]:** А – стадії передімплантаційного розвитку; В – постімплантаційний ембріональний розвиток; С – постнатальний розвиток статевих клітин та дозрівання.

Специфіка метилованої батьківської ДНК передається дочірнім клітинам. Однак у статевих клітинах, а також впродовж раннього ембріонального розвитку відбувається перепрограмування статусу

метилування геному одночасно з відновленням потенціалу розвитку. Повногеномне деметилування ДНК проходить відразу після запліднення зиготи та при утворенні примордіальних зародкових клітин, які є прямими попередниками спермійів та ооцитів [580]. У доімплантаційний період має місце пасивне деметилування при дробленні за рахунок зменшення активності метилтрансферази-1 (DNMT1), яка визначає збереження рівня метилування в дочірній ДНК після репарації [540]. Нещодавні дослідження показали, що в плюрипотентних стовбурових клітинах (ПСК) та батьківському геномі зигот поряд з пасивним проходить активне деметилування за участі 5-метилцитозингідроксилази типу 3 (TET3) і системи ексцизійної репарації нуклеотидних основ [579]. Ремодилування ДНК у чоловічих статевих клітинах проходить на стадії просперматогоній, а в жіночих – у ростучих ооцитах.

Примордіальні зародкові клітини формуються з епібласту ембріона, а отже успадковують епігенетичні ознаки клітин епібласта, в тому числі значний рівень глобального метилування ДНК [536]. Метилування дозволяє примордіальним зародковим клітинам репрограмувати отриману у спадок соматичну епігенетичну програму на патерн метилування статевих клітин зі здатністю формувати тотіпотентну зиготу в наступному поколінні [580]. Ймовірно, перепрограмування статусу метилування генома статевих клітин необхідний для корекції набутої батьками епігенетичної модифікації генома генетичними факторами та впливом середовища і встановлення нової програми розвитку [547].

За подальшого дозрівання у статевих клітинах проходить *de novo* метилування з врахуванням статі ембріона. У жіночих зародкових клітинах патерн метилування проходить постнатально, відразу після завершення пахтінної фази мейозу, під час росту ооцита [610]. Геномне метилування у самців починається перед народженням в просперматогоніях і завершується після народження, перед кінцем стадії пахітени [466, 638]. Відновлення глобального метилування відрізняються у чоловічих та жіночих статевих

клітинах: до 85% сперматозоїдів глобально метиловані CG, тоді як ооцити помірно метиловані з рівнем глобального метилування біля 30% [551, 610, 611]. Після злиття статевих клітин в доімплантаційній стадії ембріонального розвитку проходить деметилювання геному, а в подальших етапах розвитку зародків – *de novo* метилування ДНК соматичних клітин.

Після запліднення відбувається деметилювання генома. Сильно метилований батьківський геном підлягає активному деметилюванню у чоловічому пронуклеусі, однак механізм цього процесу ще не з'ясований [505, 538]. Частина батьківських генів деметилюються не в ППК, а після запліднення на стадії зиготи шляхом пасивного деметилювання [538]. Материнський геном деметилюється пасивно впродовж наступних поділів дроблення і на стадії бластоцисти більша частина геному гіпометилована [159]. Отже, диплоїдна клітина буде експресувати тільки одну батьківську копію імпринтованого гена та сайленсувати іншу, тоді як неімпринтовані гени будуть експресуватись в клітині обома батьківськими копіями. У передімплантаційний період проходить деметилювання більшості власних генів, за виключенням імпринтованих, що є важливою умовою для нормального ембріонального розвитку, тоді як деметилювання інших генів відкриває доступ до геному в недиференційному ембріоні.

**1.2.2. Мейотична інактивація статевих хромосом під час сперматогенезу.** Мейотична інактивація статевих хромосом (MSCI: meiotic sex chromosome inactivation), що відбувається у сперматогенезі самців на стадії пахітени мейозу, включає різні модифікації хроматина для інактивації Х-хромосоми. Ковалентні модифікації корових гістонів змінюють сумарний заряд, конформацію та інші властивості хроматина, що сприяє приєднанню негістонових факторів та ензимів, які відповідають за репресію транскрипції [406]. Мейотичний сайленсінг асинаптованих районів хромосом, характерний як для самок, так і для самців ссавців [438].

Геномний імпринтинг – це епігенетичний процес, що характеризується диференційною експресією генів тільки одного з двох алелей – материнської

або батьківської. В основі епігенетичного маркування генома лежить метилування цитозинових основ ДНК, що виключає транскрипцію одного з батьківських алелей [159]. Сьогодні відомо біля 80 імпринтованих генів у миші, людини та жуйних [159, 664] та підраховано, що до імпринтингу здатні біля 100-300 генів організму. Суть інактивації – пригнічення однієї Х-хромосоми жіночого набору задля вирівнювання дози експресії зчеплених з Х-хромосомою генів з індивідуумами чоловічих каріотипів (одною Х і гетероморфною Y-хромосомою). Сайленсинг гену по всій неактивній хромосомі індукує компактизацію високого рівня, яка видна як тільце Бара, яке знаходиться на периферії ядра клітин в осіб жіночої статі [58]. Однозначного пояснення біологічної ролі мейотичної інактивації статевих хромосом немає. Вважається, що формування ХУ-тільця дозволяє приховати неспарені статеві хромосоми за проходження «точки контролю» у клітинному циклі та запобігти апоптозу. Згідно іншого припущення, мейотична інактивація статевих хромосом дозволяє уникнути синтезу рекомбінантних або пошкоджених ДНК статевих хромосом у процесі мейозу [286] та сперматогенезу [287, 637].

Під час сперматогенезу у статевих клітинах відбувається реорганізація структури хроматину, що включає заміну гістонів у хроматині та подальші їх посттрансляційні модифікації: метилування, ацетилювання, фосфорилювання, убіквітинування, що відповідає активному чи неактивному стану хроматина для різних стадій сперматогенезу.

Ранні стадії сперматогенезу (сперматогоний, лептотена, зиготена) характеризуються високою транскрипційною активністю генів аутосом та статевих хромосом, що виявляється ковалентними модифікаціями гістонів – ацетилюванням гістона H4 по лізину в положеннях 5, 8, 12, 16 (H4K5, H4K8, H4K12, H4K16) та H3K9 [441], асоціацією з моно-, ди- і триметилованими за лізином 4 гістону H3 (H3K4) [389, 642].

На стадії пахітени першого поділу мейозу гетероморфні Х- та Y-хромосоми транскрипційно інактивуються та формують статеве або ХУ-

тільки [636]. Цей процес супроводжується деацетилюванням H4K12 та H4K16 і гіперацетилюванням H4K5 та H4K8. Рівень ацетилювання гістона H3K9 починає зростати на стадії пахітени, тоді як до стадії пізньої пахітени проходить деацетилювання [441]. Такий патерн ацетилювання зберігається до стадії диплотени. Також відбувається виключення таких маркерів активного хроматина, як моно-, ди- та триметилювання форм H3K4 [389, 642].

На ранній стадії пахітени проходить ди- та триметилювання статевих хромосом формами H3K9, тоді як в період середньої пахітени такі модифікації відсутні, однак знову реінтегруються на стадії пізньої пахітени [529]. Одночасно зі зниженням рівня модифікації гістонів, асоційованих з транскрипційно активним хроматином, відбувається акумулювання модифікацій, характерних для неактивного хроматину. Окрім ковалентних модифікацій гістонів неактивний стан генів статевих хромосом забезпечується асоціацією з гетерохроматиновими протеїнами HP1 $\gamma$  та HP1 $\beta$  [395, 513].

Отже, до стадії пахітени/диплотени статеві хромосоми мають гіпоацетилований гістон H4 за лізинами 12, 16 та гіпоацетилований гістон H3K9, а також збагачені характерними для неактивного хроматина ди- та триметилованими формами H3K9, uH2A, асоційовані з макроH2A1.2, гетерохроматиновими протеїнами HP1 $\gamma$  і HP1 $\beta$ . Неактивний стан статевих хромосом зберігається після першого та другого поділу мейозу та постмейотичних стадіях в сперміогенезі [529].

Для формування сайту зв'язування протеїну HP1 з хроматином необхідним є триметилювання H3K9 [296, 460]. За триметилювання H3K9 відповідає гістон-метилтрансфераза HMT, яка метилує хроматин по H3K9 та створює сайт взаємодії HP1 білка у прицентромерному гетерохроматині [560], а також взаємодіє з одним з протеїнів HP1 – HP1  $\alpha$  [671].

До таких гістонових протеїнів належать білки родини Su(var)39, які дещо відрізняються амінокислотним складом, проте схожі за загальною організацією своїх структурних доменів. Протеїни Suv39h1 та Suv39h2



родини мають у своєму складі N-кінцевий термінальний хромодомен та C-кінцевий SET домен. Численні дослідження виявили, що C-кінцевий SET домен здатен селективно метилувати гістон H3 за 9-м лізином [296, 460].

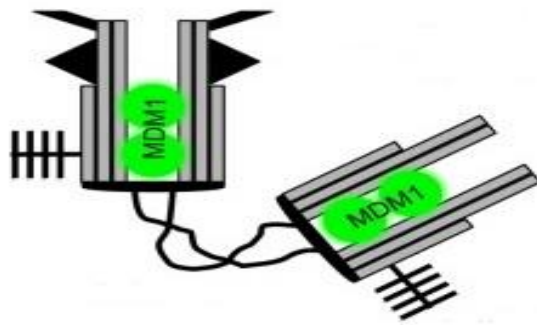
Крім відмінностей у складі протеїнів, *Suv39h1* та *Suv39h2* відрізняються за своєю локалізацією. Ген *Suv39h2* картиований у субтеломерній ділянці хромосоми 2, тоді як ген *Suv39h1* – на кінці X-хромосоми. Ген *Suv39h2* на 59% ідентичний до гена *Suv39h1*, однак відрізняється наявністю сильно основного N-кінця.

Обидва гени *Suv39h* кодують метилтрансферазу гістона H3, шляхом метилування 9-го лізинового залишку, що модулює зміни структури хроматина та сприяє посиленню зв'язків гістонів як ДНК, так і з протеїнами гетерохроматину. Метилтрансферазна активність *Suv39h1* необхідна для конденсації певних ділянок ДНК для формування мовчазного гетерохроматина [523]. Встановлено високий рівень експресії генів *Suv39h1* та *Suv39h2* впродовж ембріогенезу, тоді як у дорослих мишей ген *Suv39h2* експресується в основному у сім'яниках [533]. Інактивація гістонових метилтрансфераз *Suv39h1* та *Suv39h2* у мишей викликає мутації частини ембріонів та їх загибель. Гени *Suv39h1* і *Suv39h2* володіють взаємодоповнювальним профілем експресії у ембріогенезі миші. Встановлено безпосередній прямий вплив *Suv39h* метилтрансферазної активності на функцію центромерів, що корелює з ембріональною летальністю у пізньому періоді та спостерігається у більшості нокаутованих за геном *Suv39h* мишей. Дослідженнями виявлено, що у нокаутованих геном *Suv39h* самців не було зрілих спермій, а вага сім'яників була у 3-10 раз меншою, порівняно з мишами дикого типу [545].

На сьогодні відомо вже більше 200 генів, які беруть участь у забезпеченні якості сперми [686], однак важливе значення мають гени, які контролюють розвиток сім'яників, проліферацію та диференціацію клітин-попередників сперматозоїдів [93]. Ген *Mdm1* вперше був ідентифікований в трансформованих клітинах лінії мишей 3Т3 як ген, що розташований на

малих фрагментах хромосом, які називаються подвійними хвилинами [317]. Добре вивченим є онкоген *Mdm2*, що знаходиться біля *Mdm1* в геномах мишей і людини, однак незважаючи на подібність назви, вони не є гомологами.

Протеїн Mdm1 належить до ядерних білків, які локалізуються у центріолях клітин. Результати 3D-SIM мікроскопії виявили, що він тісно пов'язаний з триплетами мікротрубочок, ймовірно, утворює порожнину центріолей [641].



**Рис. 1.2. Схематичне зображення локалізації MDM1 просвіті центріолі (адаптовано з D. Van de Mark, 2015).**

У центросомі концентруються та взаємодіють між собою багато регуляторних молекул. У ранній інтерфазі клітина має одну центросому, отриману від половини веретена попереднього поділу. Початку подвоєння передуює ініціація дуплікації центріолей ще в кінці G1-фази клітинного циклу, що є першим морфологічним проявом підготовки клітини до мітозу. У S-фазі також проходить реплікація центріолей: біля кожної материнської утворюється одна процентріоль, яка відрізняється від «зрілої» центріолі. У постсинтетичному або премітотичному G<sub>2</sub>-періоді зникають перицентріолярні сателіти і біля кожної материнської утворюється дочірня центріоль, дещо коротша, розміщена перпендикулярно до материнської. Центріолі мають важливе значення як для правильного поділу клітин, так і для попередження анеуплоїдії та неконтрольованої проліферації [299]. Отже,

перед мітозом у G<sub>2</sub>-фазі клітина містить дві центросоми, у центрі кожної з яких, розміщені дві пари центріолей під кутом 90°. Початок формування процентріолей у G<sub>1</sub>/S-фазах збігається з початком реплікації ДНК, і продовжується у S і G<sub>2</sub> фазах.

Локалізацію *Mdm1* визначали відповідно до маркерів центріолі дистальних придатків (CER164), дистальних просвіт (CENT3), проксимального кінця (C-NAP1) і РСМ (CER152). *Mdm1* локалізується в середині проксимальної області центріолей між дистальних маркерів CIN3 та CER164 і проксимального кінця маркера C-NAP1. Доведена локалізація *Mdm1* щодо CER164, маркера повністю сформованих центріолей [641]. Це вказує на те, що ген *Mdm1* пов'язаний з центріолями і локалізується в процентріолях. *Mdm1* рекрутується центріолями на початку мітозу, коли дуплікація центріоль завершена і центросоми почали процес дозрівання, який є необхідним для формування батьківських центріоль у наступного клітинного циклі [655].

Надлишкова експресія гену *Mdm1* призводить до відтермінування дуплікації центріолей, тоді як зменшення *Mdm1* – до збільшення грануляції ядерного матеріалу, що є характерним на ранніх проміжних стадіях при формуванні центріолей. Дослідженнями Van de Mark D. (2015) [641], визначено нуклеотидну послідовність ділянки *Mdm1*, яка відповідає за зв'язок мікротрубочок, і встановлено, що ці повтори присутні також в CCSAP, іншому протеїні, який зв'язується з мікротрубочками. Ці результати вказують на те, що *Mdm1* є негативним регулятором дублікації центріолей і його дія може бути опосередкована через безпосередній контакт з мікротрубочками центріолей. Можливий механізм інгібування дублікації центріолей проходить через взаємодію *Mdm1* зі сайтами зв'язування на ближньому кінці центріолей, що блокує надходження певних протеїнів або комплексу, необхідного для дублювання. Надекспресія *Mdm1* блокує як дублікацію центріоль клітин RPE-1, так і подвоєння (редуплікацію) центріолей клітин U2OS, які зупинилися у S фазі. Оскільки редуплікація відбувається через

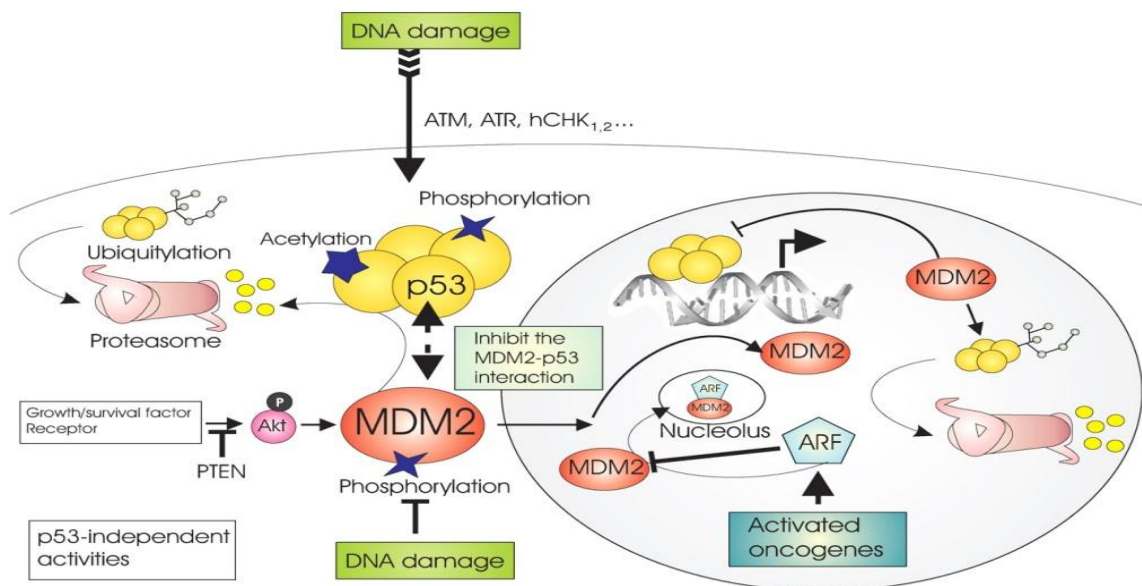
повторення циклів роз'єднання та утворення центріолей [486], це вказує на те, що *Mdm1* впливає на обидві функції канонічного шляху дублювання. Механізм ORC1, який також належить до негативного регулятора дублювання центріолей, специфічно блокує лише редуплікацію [407]. Присутність *Mdm1* в процентріолях в кінці G2 фази може бути сигналом, що дублювання завершено. Інша можливість полягає в тому, що процентріолі можуть бути структурні дефекти за відсутності *Mdm1*.

Ген *Mdm1* спочатку був ідентифікований як частина амплікона в мишачих пухлинних клітин, як і *Mdm2*, інгібітор p53, який не пов'язаний з *Mdm1* [317]. Доведено, що надлишкова експресія *Mdm2* запускає апоптоз шляхом блокування p53-опосередкованих змін, але, можливо, що надлишкова експресія *Mdm1* також має відношення до фенотипів ракових клітин, в яких він посилюється [641].

Білок p53 (продукт гену *TP53*) відіграє важливу роль у регулюванні транскрипції та клітинного циклу, апоптозу, сприяє підтриманню геномної стабільності клітин [439]. p53 є головним регуляторним протеїном клітин за рахунок здатності зупиняти клітинний цикл та індукувати апоптоз [301]. Близько 50% усіх онкологічних захворювань викликано мутаціями у гені *TP53* [63]. У відповідь на сигнали про пошкодження ДНК, у клітинах проходять пост-трансляційні модифікації, зокрема фосфорилювання та ацетилювання певних амінокислот молекули p53, що змінює їх конформацію, сприяючи підвищенню активності та вмісту p53, що блокує зупинку клітинного циклу до репарації пошкоджень ДНК або індукує апоптоз [98]. Нормальне функціонування p53 сприяє видаленню клітин з мутацією та генетичними дефектами, які є потенційними онкогенами та здатні до злоякісної трансформації [239].

Ключову роль у стабілізації та підвищенні транскрипційної активності білка p53 відіграють зміни за взаємодії p53 з білком-інгібітором Mdm2. Білок Mdm2 відноситься до ензимів групи E3 системи убіквітин-залежного протеолізу, який каталізує перенесення активованого убіквітина з ензиму

групи E2 на білок p53. Тоді білок p53 стає субстратом для 26S-протеасоми. У не стресових умовах постійно утворюється комплекс Mdm2:p53 та проходить протеоліз p53, що призводить до низької концентрації його у клітині (рис. 1.3). Отже, підвищена експресія білку Mdm2 є онкогенним фактором, а сам білок відноситься до протоонкогенів [97].



**Рис. 1.3. Роль білка Mdm2 у регуляції функціонування білка p53** [519].

За дії стресу, білок Mdm2 взаємодіє з білком p53 за типом зворотного негативного зв'язку: p53 активує експресію білку Mdm2, діючи як транскрипційний фактор для гена *Mdm2*, а білок Mdm2 каталізує перенесення активованого убіквітину з ензиму групи E2 на білок p53. Своєю чергою, Mdm2 здатен інгібувати p53 двома різними шляхами [411]. Низький вміст Mdm2 індукує моноубіквітинзалежну деградацію p53 шляхом каталітичного приєднання залишків убіквітина та транспортування p53 з ядра до цитоплазми для додаткового убіквітирування та деградації в 26S протеасомах [544].

Однак більша частина моноубіквітинованого p53 прямує до мітохондрій, може піддаватися деубіквітинуванню за допомогою протеїну HAUSP (herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease), що кодується геном

*USP7* (Ubiquitin-specific-processing protease 7). Зв'язок між *Mdm2* та *HDAC1* (Histone deacetylase 1) сприяє деацетилюванню p53 та його деградації [425]. Отже, не зважаючи на те, що ген, кодує p53, постійно транскрибується та транслюється, сам білок швидко піддається залежної від убіквітину деградації [239]. За високої концентрації білка *Mdm2* запускається поліубіквітинування і деградація p53 в ядрі [476]. *Mdm2* також здатен інгібувати транскрипційну активність білка p53 відносно генів-мішеней, зв'язуючи його N-термінальний трансактиваційний домен та блокуючи взаємодію з іншими факторами транскрипційного апарату [99].

Взаємна регуляція p53 — *Mdm2* дозволяє обмежувати тривалість та інтенсивність p53-залежної відповіді на дію генотоксичних факторів, а також забезпечує низький рівень p53 в нормальних клітинах.

У відповідь на стрес-сигнали про пошкодження ДНК білок p53 швидко накопичується, стабілізується та повністю активується у клітині після звільнення від *Mdm2*, до прикладу, при зв'язуванні *Mdm2* з пухлинним супресором ARF в ядрі [423]. Водночас за високого рівня білка p53 за дії негативного зворотнього зв'язку з ARF, рівень ARF знижується та збільшується взаємодія між *Mdm2* та p53. Стрес-сигнали активують також ATM/CHK2 та ATR/CHK1-кінази. За пошкодження ДНК кіназа DNA-PK (DNA-activated protein kinase) фосфорилує *Mdm2* по Ser-17 в p53-зв'язувальному домені, що знижує його убіквітинлігазну активність, і, як наслідок, сприяє стабілізації білка p53. Тоді як фосфорилювання *Mdm2* кіназою ATM по залишку серину Ser-17, розміщеному біля RING-домена, негативно впливає на здатність білку експортувати p53 з ядра [506]. На відміну від p53, фосфорилювання C-термінальних кінців білків *Mdm2* та *Mdm2* викликає їх швидку дестабілізацію. Деградація фосфорильованих *mdm2* та *mdm4* призводить до стабілізації p53.

Фосфорилювання *Mdm2* протеїнкіназою c-Abl (Abelson tyrosine-protein kinase) сайтом Ser-394 знижує здатність *Mdm2* взаємодіяти з p53, що передбачає його деградацію та сприяє стабілізації p53 при пошкодженні ДНК

[390]. АТМ також активує кіназу c-Abl, яка фосфорилує Mdm2 по Tyr394 та Mdm4 по Tyr 99, що знижує їх здатність інгібувати білок p53. АТМ-активована кіназа CHK2 фосфорилує додаткові сайти всередині Mdm4, тим самим знижує його зв'язок з 14-3-3-протеїнами та його убіквітинуювання за рахунок Mdm2. CHK2-опосередковане фосфорилування Mdm4 порушує його взаємодію з деубіквітиновим ензимом убіквітин-специфічною протеазою HAUSP (herpesvirus associated ubiquitin-specific protease), що сприяє убіквітинуюванню та протеосомній деградації [656]. У кислотному домені Mdm2 також локалізовано багато сайтів фосфорилування для інших кіназ. Так, фосфорилування по залишках Ser-240 та Ser-254 серин-треоніною кіназою GSK-3 $\beta$  сприяє активації Mdm2-залежної деградації p53 [468]. Своєю чергою у період відновлення, у клітині можливий інших механізм дефосфорилування Mdm2 фосфатазою Wip1 по Ser395, сайтом фосфорилування АТМ, що полегшує взаємодію між Mdm2 і p53 та інгібує аутоубіквітинуювання Mdm2.

Встановлено, що Mdm2 здатен знижувати ацетилювання білка p53, при зміщенні залишку p300, інгібуючи та руйнуючи білок PCAF. Mdm2 також може рекрутувати гістонові деацетилази HDAC1 та KAP1, тим самим репресуючи ацетилювання p53 або гістонів у місцях їх зв'язування з p53 [336, 519]. У зв'язку зі здатністю зміщувати деацетилази або убіквінувати гістон H2B, а, можливо, і через інші механізми Mdm2, білок асоціюється з p53-молекулою у зоні промоторів генів-мишеней, тим самим негативно впливає на трансактивацію p53. Білок p53 напряму активує транскрипцію гена *Mdm2* після зв'язування з 2-ма сусідніми p53-респонсивними елементами у ділянці його промотора, а збільшення експресії *Mdm2* відповідно сприяє деградації p53. Така саморегуляція за типом зворотного зв'язку контролює рівень p53 для підтримки гомеостазу в клітинах, що не піддавалися стресу, і відновлення гомеостазу у випадку реакції на стрес [468].

Узагальнюючи нечисельні дані щодо гена *Mdm1*, можна стверджувати, що формування трубчастих структур мікротрубочок, їх стабілізація

відбувається за активної участі продукта гена *Mdm1*, однак з'ясування його конкретних функцій за умов стресу вимагає подальших досліджень.

### **1.3. Вплив екологічних чинників на репродуктивну функцію**

Підвищене техногенне навантаження організму ксенобіотиками зумовлює виражені зміни його мікроелементного статусу, що призводить до погіршення здоров'я населення і дисфункції репродуктивної системи [90, 213]. Безпліддя є одним із інтегральних показників порушення репродуктивного здоров'я. За останні роки спостерігають зростання частоти й поширеності хвороб сечостатевої системи, які посідають 5 місце у структурі загальної захворюваності населення нашої держави [152].

Навіть відносно низькі концентрації ВМ, що реєструються практично в усіх об'єктах довкілля і досить часто не призводять до клінічно виражених проявів, сприяють погіршенню репродуктивного здоров'я. Враховуючи складні механізми взаємодії хімічних елементів та зростання техногенного забруднення ними довкілля, проблема попередження надходження екотоксикантів в організм тварини та людини [49, 141, 237], прискорення їх елімінації та зниження проявів токсичності є надзвичайно актуальною. З'ясування впливу сполук металів на репродуктивну здатність, особливості кумуляції та взаємодії біогенних та абіогенних мікроелементів, дозволить скорегувати відхилення в мінеральному обміні на початкових етапах і, тим самим, попередити розвиток хвороб, які спричинені недостатнім надходженням мікроелементів до організму чи підвищеним техногенним навантаженням ксенобіотиками.

Під впливом екологічних факторів довкілля розвивається гормональний дисбаланс між концентраціями тестостерону і гонадотропних гормонів, що певною мірою компенсується активацією гіпоталамо-гіпофізарної системи [172]. Тоді як за умов підвищеного антропогенного навантаження у чоловіків спостерігають виражені зміни гормонального



профілю, що призводять до розвитку синдрому андрогенної недостатності та ідіопатичного безпліддя [22, 156]. Доведено, що Свинець та Кадмій відіграють важливу роль в патогенезі порушення фертильності чоловіків. Вони зумовлюють розвиток гіпогонадізму та погіршення сперматогенезу, тоді як Цинк покращує ці процеси, знижуючи в'язкість сперми ( $r=-0,98$ ;  $p<0,05$ ) та підвищуючи вміст тестостерону в крові, концентрацію і рухливість сперматозоїдів у еякуляті [151]. Цинк опосередковано впливає на рівень статевих гормонів у крові чоловіків через стимуляцію системи «гіпофіз-гонади», діючи безпосередньо на процеси сперматогенезу в сім'яниках.

Незбалансоване харчування при підвищеному надходженні абіотичних елементів призводить до вираженого дефіциту есенціальних мікроелементів, що потенціює ризик для репродуктивного здоров'я, підвищує навантаження на бар'єрно-детоксикаційні системи організму [151], сприяє розвитку синдрому «екологічної дезадаптації».

Мікроелементи, що регулюють обмінні процеси в організмі умовно поділяють на елементи з низькою, середньою і високою гомеостатичною ємністю [13]. При гомеостатичній адаптації підвищується опірність організму до негативного впливу Свинцю і Кадмій, які належать до елементів з високою гомеостатичною ємністю, при їх надходженні в межах допустимих величин. Натомість відхилення в концентрації Цинку і Купруму, що характеризуються низькою гомеостатичною ємністю, організм переносить важче [19].

Активно вивчається вплив есенціальних мікроелементів (МЕ) та важких металів (ВМ), оскільки механізми їхньої взаємодії пов'язані між собою. Так, Кадмій витісняє Кальцій, а відтак опосередковано впливає на ензими, передусім на протеїнкінази [167]. Кадмій також конкурує з Цинком за можливість зв'язуватись з протеїнами [263], що призводить до порушення важливих ензиматичних реакцій. Токсичність Кадмію знижується за присутності йонів Цинку та Купруму [263], які здатні конкурентно інгібувати

його поглинання гепатоцитами та інтестинальними клітинами і накопичення з проксимальних каналців нирок. За умови підвищеного техногенного забруднення довкілля у сироватці крові жінок виявлено на 20% нижчий вміст Цинку, що зумовлене його витісненням Свинцем та Кадмієм [151]. Доведено, що вміст Кадмію є значно вищим у людей з недостатнім рівнем Цинку [482]. Надлишок Кадмію призводить також до дефіциту Селену [10].

Забруднення Кадмієм пов'язане з переробкою побутових і промислових відходів, металургійним виробництвом, викидами автотранспорту, антикорозійних покриттів, проте істотним джерелом забруднення повітря є тютюновий дим [6, 214]. Затримка Кадмію в організмі курців у 1,5–2 рази вища порівняно з тими, хто не курить [263]. Кадмій накопичується в організмі з періодом напіврозпаду 10-30 років [54, 263]. Хронічна експозиція до Кадмію призводить до розвитку анемії, уражень печінки і нирок, кардіопатій, остеопорозу, гіпертонії, змін імунної системи [6, 212, 453]. Висока накопичувальна здатність кадмію хлориду виявлена у паренхіматозних органах щурів молодих з градієнтом розподілу: нирки-печінка-серце-скелетний м'яз-мозок, при надходженні токсиканту у дозах малої інтенсивності [54]. В організмі Кадмій знаходиться переважно у зв'язаному стані – в комплексі із металотіонеїнами [178]. Хронічна експозиція до Кадмію поступово індукує селективний синтез цинк-, кадмій-металотіонеїн, що виснажує цю систему і викликає сайт-специфічну деградацію ДНК [244, 263, 626].

### **1.3.1. Біологічна дія важких металів на репродуктивну функцію.**

Завдяки високій токсичності та міграційній здатності, схильності до біокумуляції та повільного виведення з організму, Кадмій виявляє шкідливий вплив на стан здоров'я, особливо у період вагітності [36, 96, 263].

Ембріотоксична дія Кадмію проявляється у порушенні будови скелета, лица, нервової трубки плодів, важкими формами олігогідрамніонії [263, 571]. Нез'ясованим залишається вплив інгаляційного надходження Кадмію на фертильність та розвиток плодів. Так, надходження Кадмію в період

вагітності викликає тератогенний та ембріотоксичний ефекти [47, 525]. Встановлено, що концентрація Кадмію в плаценті у 10 разів вища, ніж у материнській крові та у 59 раз, ніж у пуповинній [448]. Поза тим встановлено, що плацента служить надійним або майже надійним бар'єром для проходження токсичних мікроелементів [550].

Висока проникність Свинцю і Кадмію через гематотестикулярний бар'єр призводить до зниження функціональної активності тестикулярної тканини, а також опосередковано впливає на гіпоталамо-гіпофізарну систему, підвищуючи рівень ентропії у морфофункціональній системі сім'яників за сукупної дії внутрішньосудинних та внутрішньостінкових факторів через ушкодження епітелію та сероцитів, порушення цілісності базальної мембрани [150]. Встановлено, що Кадмій належить до ендокринних деструкторів [263, 359] і здатний проявляти естрогенну й андрогенну активність [60].

Епігеномні механізми Кадмію пов'язані з індукцією мутацій, пероксидним окисненням ліпідів, заміною йонів Цинку в доменах «цинових пальців» та інших нуклеопротейдах; конкуренцією з Кальцієм в кальційзалежних процесах реплікації, транскрипції, фосфорилування і ДНК-фрагментації [10, 178]. Йони Кадмію зв'язуючи сульфгідрильні групи глутатіону та протеїнів, викликають активацію пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) клітинних мембран, що викликає порушення їх функції та призводить до утворення активних форм Оксигену [7]. Кінцевим етапом є порушення морфофункціонального стану мембран, вихід з лізосом кислих гідролаз, загальне посилення гідролітичних процесів у тканинах, накопичення токсичних продуктів аутолізу, порушення синтезу ДНК [49], дезінтеграція мембран і загибель клітини [40].

Для абіогенних металів (Кадмій і Свинець) найбільший ступінь накопичення характерний для плаценти, у той час, як для біогенних мікроелементів (Цинк і Купрум) їх вміст в організмі плоду та плаценті суттєво не відрізняється. Це вказує на посилення трансплацентарного

переходу есенціальних мікроелементів для забезпечення оптимальних умов формування та розвитку плоду [152].

Ефективність бар'єрної функції плаценти щодо проходження іонів ВМ модулюється материнським поліморфізмом генів, що кодують металотіонеїни, котрі зв'язують як есенціальні МЕ (наприклад, Цинк і Купрум), так і токсичні (Свинець і Кадмій) [214]. Така взаємодія ВМ із металотіонеїнами є клітинним механізмом захисту плоду від токсичного впливу металів, проте цей же механізм запобігає надходженню есенціальних МЕ до плода.

Прийнятним рівнем Кадмію в крові людини вважається 0,007 мг/л із коливанням у межах 0,004-0,013 мг/л [215]. За даними Центру з контролю за захворюваннями (США), безпечний вміст Кадмію у крові дорослої людини становить 0,005 мг/л, рівень «настороженості» – 0,005-0,01 мг/л, потенційно шкідливий рівень – понад 0,01 мг/л [218].

Нікель належить до групи ультрамікроелементів. Він є кофактором низки ензимів, зокрема 5-нуклеозидфосфатази аргінази, уреази, ацетил-КоА-декарбоксилази, Ni/Fe-гідрогенази, ензимів шлунко-кишкового тракту [176, 264]. Під час ембріонального розвитку Нікель концентрується у тканинах та органах, які пов'язані з кровотворною функцією, задіяні в біосинтезі гормонів, вітамінів, біологічно активних речовин. У цей період Нікель виявляють у печінці і селезінці плода людини вже на 20-25 тижні вагітності. Абсорбція Нікелю у період вагітності та лактації підвищується [264].

Біологічна роль Нікелю пов'язана з його участю в структурній організації та функціонуванні основних клітинних компонентів – ДНК, РНК і білка [264]. Йони  $Ni^{2+}$  стабілізують структуру нуклеїнових кислот та рибосом [380, 543], однак їхній надлишок змінює характер протікання процесу біосинтезу протеїну внаслідок гідролізу тРНК. Процеси його обміну та всмоктування аналогічні до таких елементів як Ферум, Купрум і Цинк. Нікель впливає на окиснення аскорбінової кислоти, прискорює перехід

сульфгідрильних груп у дисульфідні, здатен пролонгувати дію інсуліну та може проявляти канцеротоксичність [45, 264, 539].

Водночас йони Нікелю є досить агресивним мутагенним, канцерогенним та токсичним фактором. Згідно класифікації Міжнародного агентства по дослідженню раку (IARC) деякі сполуки Нікелю (металічна пилюка нікелю та гіпосульфат нікелю) визнані канцерогенними та включені до офіційного реєстру канцерогенних речовин BOO3, як один з найбільш небезпечних забруднювачів навколишнього середовища [176, 264]. Механізми нікель-індукованого канцерогенезу невідомі, хоча цьому питанню присвячено багато досліджень. Ці механізми можуть бути як генетичні, так і епігенетичними. Доведена генотоксична та мутагенна дія високих доз йонів Нікелю [437]. За введення Нікелю дозою 100 мг/кг у щурів спостерігали зниження маси тіла самки та ембріонів при значній ембріолетальності зародків [272]. При цьому вміст Нікелю у тканинах ембріонів був вищим, порівняно з вмістом в органах матері, що доводить чутливість плодів до надлишкового надходження Нікелю [413, 657]. Чисельними дослідженнями *in vitro* та *in vivo* на клітинних лініях та тваринах показано, що Нікель порушує репродуктивну функцію як через вплив на статеві органи, так і за впливу на гормональні та нейроендокринні рівні регуляції [381], зокрема, завдяки металоестрогенній здатності, здатний дестабілізувати ендокринну систему організму [283].

Генотоксичний ефект йонів важких металів реалізується як через механізми порушення структури ДНК за безпосереднього впливу на процеси транскрипції, трансляції та реплікації [110], так і через пригнічення системи антиоксидантного захисту. Йони Нікелю здатні викликати одно- та дволанцюгові розриви, модифікацію основ, зокрема формування 8-гідроксидезоксигуанозинових похідних. Такі ушкодження запускають механізми зупинки клітинного циклу та репарацію ДНК, а у разі критичних ушкоджень, активуються процеси апоптозу [264] чи виникає ймовірність ініціації канцерогенезу [347, 357], що пов'язано зі здатністю Нікелю викликати епігенетичні зміни (метилування ДНК, гіпоацетилювання і

посттрансляційна модифікація гістонів та ін.) [284, 329]. Особливо важливим є період раннього ембріогенезу, оскільки саме у цей період відбувається фіксація основних епігенетичних маркерів [33, 563], які здатні призводити до виражених фенотипічних наслідків.

Одним з можливих механізмів Нікелю є його здатність впливати на метаболізм деяких металів, таких як  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , замінюючи їх у метал-залежних ензимах. Нікель здатний безпосередньо зв'язуватися з протеїнами на поверхні клітинної мембрани та індукувати Т-клітинну відповідь [70]. Токсична дія йонів Нікелю зумовлена ослабленням антиоксидантного захисту клітини через зв'язування йонами металів сульфгідрильних груп глутатіону та ліпоєвої кислоти [110]. Це призводить до індукції оксидативного стресу, підвищення вмісту активних форм кисню, що викликає ушкодження ДНК і також дестабілізує реалізацію генетичного матеріалу [264].

Надлишкове надходження йонів Нікелю подібне до дієти з недостатньою кількістю холіну та фолату, що призводить до інгібування активності ДНК-метилтрансферази, що призводить до гіпометилування ДНК [384] та геномної нестабільності. Показано, що з рівнем метилування ДНК прямо корелює доступність певних мікроелементів і вітамінів, залучених до метаболізму фолату, метіоніну, холіну, які є основними донорами метильних груп [33]. Зміни в характері метилування можуть виявлятися в інших генах, що відіграють важливу роль при розвитку метаболічних і кардіоваскулярних захворювань. Доведено, що йони Свинцю і Нікелю володіють також трансплацентарною здатністю, що може призводити до канцерогенних ефектів та епігенетичних змін [607]. Дія важких металів може також провокувати модифікацію гістонів і ремоделюванню хроматину [328]. Крім того, важкі метали, зокрема і Нікель здатні функціонувати як ендокринні дестабілізатори імітуючи дію естрогенів, що призводить до зменшення кількості естрогенових рецепторів.

**1.3.2. Біотехнологічні методи стимулювання відтворювальної здатності за впливу біогенних мікроелементів.** Оптимальний вміст і співвідношення біогенних металів у організмі зумовлюють нормальний перебіг обмінних процесів, сприяють змінам функціональної активності органів і систем, що позитивно впливає на фертильність та відтворення. Для ефективного застосування мінерального комплексу необхідним є розуміння механізмів впливу кожного елементу, їх взаємозв'язку з різними ланками метаболічних процесів. Дуже важливим є забезпечення мікронутрієнтами організму на прегравідарному етапі та у період гестації, а також їх використання як корегуючих метаболізм факторів за екологічно зумовленими порушеннями репродуктивної функції [36].

Цинк, як есенціальний мікроелемент, входить до складу близько 200 металоензимів, які беруть участь у вуглеводневому, протеїновому та нуклеїновому обмінах [668]. Крім того, він входить до складу неензимних металопротеїнів, для активації яких необхідно утворення комплексів з катіонами Цинку [5]. Здатність цього мікроелементу брати участь у процесах лігандоутворення з органічними молекулами пояснює надзвичайно широкий спектр його участі у різних біологічних системах [236].

Доведено важливу роль Цинку у синтезі нуклеїнових кислот. Так, більш ніж 3% від ідентифікованих генів людини містять у своєму складі Цинк. Результатами ряду досліджень встановлено, що до складу деяких факторів транскрипції входять цинк-вмісні функціональні домени, так звані «цинкові пальці», які складаються з 30-ти амінокислотних залишків, розташованих навколо йона Цинку. Ці ділянки опосередковують процеси зв'язування транскрипційних факторів з молекулою ДНК та їхню участь у контролюванні функціональної активності генів [5, 479].

Значна частка внутрішньоклітинного Цинку локалізована в ядрі, що пояснює його участь у процесах відтворення генетичної інформації, поділі, рості та диференціюванні клітин. Тому цей мікроелемент має надважливе значення для ембріогенезу [306].

Цинк відіграє важливу роль у дозріванні ооцитів, овуляції та регуляції статевого циклу, а також як регулятор антиоксидантних процесів впливає на процеси лютеолізу та атрезії фолікулів [21, 223]. Процес нidaції ембріонів проходить за дії металопротейназ, які належать до родини цинк-вмісних протеїназ. Він входить до структури рецепторів естрогенів, а тому впливає на естрогензалежні процеси. За впливу препаратів Цинку підвищується рівень статевих і фолікулостимулюючого гормону [26, 236]. Потреба у споживанні цього мікронутрієнту в період вагітності значно зростає, адже він вкрай необхідний для нормального перебігу вагітності, лактації та розвитку плода. За дефіциту цього біоелемента виникають гестози, викидні, передчасні та складні пологи, дефекти посліду. Знижений рівень Цинку при вагітності може призводити до патологічного перебігу вагітності, вірогідної внутрішньоутробної затримки розвитку плода [566], народження недоношених дітей з малою масою тіла та вадами розвитку [178, 236]. Підтверджено, що у 13-18% вагітних з дефіцитом Цинку відмічали вади розвитку плодів та новонароджених [581], а у 42 % недоношених дітей із затримкою внутрішньоутробного розвитку, спостерігається виражений дефіцит Цинку і Cu/Zn-супероксиддисмутази у сироватці крові [682, 236]. У матерів з клінічно нормальним перебігом вагітності, діти яких народилися з низькою масою тіла, спостерігався підвищений рівень  $\alpha$ -фетопротейну (AFP > 90-й перцентиль) та низький рівень Цинку в плазмі крові й лейкоцитах [28, 236]. Підтверджено також його значення для нормального неонатального розвитку дитини [669].

Важливу роль Цинку в процесах сперматогенезу доводять дослідження, які встановили, що вміст останнього в еякуляті з нормальною фертильністю у 9,3 разів вище, ніж у спермі безплідних чоловіків [151]. Вміст Цинку в спермі фертильних чоловіків, які проживають у промисловій зоні, виявився у 1,2-1,9 разів нижчим за фізіологічний рівень [20], що зумовлено формуванням цинкдефіцитного стану та є фактором ризику погіршення репродуктивного здоров'я.



Цинк також має антиоксидантні та протизапальні властивості [28]. При його зниженні в плазмі крові пропорційно підвищуються маркери оксидантного стресу і генерація прозапальних цитокінів, ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-8 [28, 178]. Висока концентрація Цинку у репродуктивних органах зумовлена його участю у регуляції вільнорадикальних процесів клітинного метаболізму, як есенціальної частини СОД. Інтенсивність синтезу та каталітична активність Cu/Zn-супероксиддисмутази залежить від біологічної доступності Цинку і Купруму. Синтез стероїдних гормонів у сім'яниках проходить за стимуляції процесів ПОЛ як за фізіологічного перебігу сперміогенезу, так і внаслідок прямої ензимопатичної дії ксенобіотиків, що вимагає активації системи антиоксидантного захисту, одним з ключових мікроелементів якої є Цинк. Його дефіцит призводить до зниження рівня тестостерону, олігоспермії, вираженого імунодефіциту за рахунок зниження Т-хелперів, інтерлейкінів (ІЛ-2) і цитокінів [27].

Основною причиною дефіциту Цинку в організмі вважається біодоступність, а не недостатня його кількість в дієті [236]. Аліментарна нестача цього мікроелемента розвивається при його недостатньому вмісті в раціоні і/або при низькому рівні всмоктування в кишківнику [5], а також внаслідок порушень гомеостатичних механізмів, коли організм втрачає здатність утилізувати в достатній кількості екзогенний і зберігати ендогенний Цинк [5, 488].

Окрім аліментарної причини, дефіцит Цинку може виникати за його підвищеної потреби для організму, зокрема під час вагітності. За його дефіциту зменшується виділення ФСГ та ЛГ [223]. Недостатнє надходження в активні періоди росту організму призводить до затримки росту і низькорослості [193], підвищення рівня захворюваності та зниження імунітету. Дефіцит Цинку та Купруму провокує знижену активність ензимів АОЗ, що може призводити до пошкодження плаценти, затримки внутрішньоутробного розвитку плода, викиднів [152, 375]. Проблеми, пов'язані з дефіцитом Цинку, є вкрай важливими. У 2002 році ВООЗ встановила, що близько половини людства

страждає від недостатнього надходження Цинку в організм, тоді як достатнє споживання цього мікроелементу суттєво знижує дитячу смертність [542]. Під час вагітності Цинк бере участь у розвитку головного мозку плода, впливає на перебіг пологів [215]. Встановлений взаємозв'язок між низьким рівнем Цинку та важкістю післяпологової депресії [665]. Потреба в Цинку під час вагітності зростає вдвічі, тоді як щоденна дієта забезпечує 50% від денної потреби в мікроелементі [402]. Відтак проблема дефіциту Цинку залишається актуальною. Фізіологічно прийнятною концентрацією цинку в крові людини вважають 6,54 мг/л з коливаннями в межах від 1,6 до 8,0 мг/л. Діагноз «цинк-дефіцитний стан» ставиться за вмісту Цинку в крові менше за 0,85 мг/л [214].

Манган належить до найважливіших біоелементів і є компонентом багатьох ензимів. Він має безпосередній вплив на обмін вуглеводів, оскільки бере участь у синтезі глікопротеїнів, забезпечує нормальну секрецію інсуліну, холестерину. Манган є активатором кокарбоксилази, знижує вміст піровиноградної кислоти і потреби організму в тіаміні. Він входить до есенціальної частини СОД, яка відіграє ключову роль у регуляції вільнорадикальних процесів клітинного метаболізму. В організмі Манган бере участь в активуванні ізоцитратдегідрогенази, яка декарбоксилює малатдегідрогеназу і піруватдекарбоксилазу [42], та в синтезі глікозаміногліканів хрящової тканини, в еритропоезі та утворенні гемоглобіну. Він володіє ліпотропною дією, активуючи синтез холестеролу з ацил-КоА через карбонові кислоти [138], що вказує на його роль у ліпідному обміні. Роль Мангану в процесах окисного фосфорилування підтверджується швидким його накопиченням у мітохондріях клітин печінки.

Значний вплив цей елемент має на ріст і розвиток тварин, репродуктивну функцію. Нестача Мангану негативно впливає на відтворювальну здатність, що проявляється прихованою охотою, низькою запліднювальною здатністю, викиднями, гінекологічними захворюваннями [234]. Манган пов'язаний з кровотворними процесами, викликаючи підвищення рівня поліхроматофільних нормобластів, еритроцитів, об'єму

циркулюючої крові й рівня гемоглобіну [127]. Дія його на кісткову тканину зумовлена активуючим впливом на лужну фосфатазу та синтез кислих глікозаміногліканів у матриці кістки [238].

Дефіцит Мангану знижує частоту запліднення, викликає розлади статевого циклу, резорбції плодів, аборт і мертвонародженість [234] та виродження яєчок у самців [456]. Солі Мангану, введені внутрішньошлунково у дозах 0,05 і 0,1 г/кг чи інгаляційно в концентрації 1 мг/м<sup>3</sup>, негативно впливали на сперматогенез та ембріогенез білих щурів, тоді як доза 0,15 г/кг викликала стерильність. Внутрішньовенне введення MnCl<sub>2</sub> у дозі 3,5 мг/кг викликало структурні зміни в сім'яниках кролів. Мутагенна дія мангану (II) хлориду виявлена за одноразового внутрішньоочеревинного введення щурам в дозах 25 і 50 мг/кг та за тривалого вживання впродовж 7 місяців у дозі 0,5 і 0,05 мг/кг [230]. Тоді як інгаляційне надходження двоокису маргану у концентрації 30 мг/м<sup>3</sup> збільшило кількість клітин кісткового мозку з абераціями хромосом і зменшило кількість аберантних гепатоцитів щурів [161].

Манган є важливою складовою в антиоксидантній системі захисту організму. Майклом Дейлі вперше доведено, що йони Мангану беруть участь в специфічному процесі детоксикації клітин від окиснювального стресу [346]. У роботі [185] було встановлено, що дієта без Мангану або із вмістом Мангану в сольових сумішах, що перевищують його біотичні кількості в 10-20 раз, сприяє підвищенню активності церулоплазміну і зменшенню накопичення вітаміну А в печінці щурів.

Купрум є компонентом низки ензимів, зокрема каталази, цитохром-с-оксидази, церулоплазміну, Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>-супероксиддисмутази (СОД1 та СОД3), поліфенолоксидази, тирозинази, аскорбінооксидази, аскорбінкінази, альдолази [77, 405, 645]. Він бере участь у процесах ангіогенезу, транспортуванні кисню, формуванні структури протеїнів сполучної тканини – колагену та еластину [138]. На клітинному рівні Купрум необхідний для циклу Кребса. Однією з найважливіших функцій цього мікроелементу є участь у процесах

гемопоезу. Купрум є каталізатором окислення аскорбінової кислоти, адреналіну, серотоніну, приймає участь в процесах обміну заліза, а також забезпечує динамічну рівновагу концентрації біогенних амінів в крові [128].

Купрум відіграє важливу роль у відтворенні тварин, під час ембріонального та постнатального періодів онтогенезу, лактації. Він пов'язаний з метаболізмом естрогенів. Дисбаланс призводить до сексуальної дисфункції, передменструального синдрому, утворення кіст яйників, неплідності або викиднів [36]. Під час вагітності концентрація Купруму значно зростає. Інтенсивне депонування цього мікроелементу спостерігається з 2 по 9 місяць вагітності [178]. Купрум характеризується найбільш вираженими особливостями транслокації в системі «мати-плацента-плід»: її рівень в плаценті та ембріонах зростає у 2,7 та 2,8 разів відповідно, порівняно зі вмістом у крові самки [401], тоді як концентрація Цинку збільшується лише в 1,4 рази [151]. Він є необхідним для розвитку ембріону. Встановлено, що у недоношених новонароджених вміст Купруму є нижчим, ніж у доношених і впродовж 2-х місячного періоду зберігається від'ємний баланс Купруму. За відсутності профілактики дефіциту цього мікроелемента можливий розвиток купрумдефіцитного стану.

Надходження Купруму з організму матері до плоду забезпечується церулоплазміном і він використовується у синтезі купрумзалежних ензимів, а також акумулюється в гепатоцитах [138]. Низький вміст церулоплазміну у поєднанні з високим вмістом Купруму в печінці новонародженого є діагностичною ознакою хвороби Вільсона [123, 646]. Частина йонів Купруму також переноситься шляхом адсорбції в кров плоду з амніотичної рідини, однак основний обмін йде через ворсинки хоріону. У плода Купрум накопичується у печінці, селезінці та в головному мозку, проте після народження концентрація цього металу в згаданих органах знижується [9]. Високий вміст Купруму в тканинах на ранніх стадіях ембріонального розвитку зумовлений високим рівнем синтетичних процесів [128], які забезпечують енергетичні потреби для формування тканин і органів.

Значний дефіцит надходження Купруму може викликати завмирання вагітності, значні аномалії розвитку плода, порушення гемопоезу плоду [47, 646]. З дефіцитом цього мікроелемента також пов'язують такі постнатальні розлади здоров'я, як м'язова гіпотонія, порушення кровообігу новонародженого, гепатоспленомегалія, кісткова дисплазія, затримка психомоторного розвитку в грудному віці. У жінок, які проживали на територіях, забруднених Купрумом та її сполуками, виявлено ускладнений перебіг вагітності та затримки внутрішньоутробного розвитку плода [618]. Надлишкова кількість Купруму викликає тератогенний та ембріотоксичний ефекти. В експериментах на тваринах встановлено, що сульфат купруму в дозі 4,25 мг/кг викликав резорбцію 86% зародків у самок золотистого хом'ячка, цитрат купруму в дозі 2,20 мг/кг у щурів викликав 34% постімплантаційну загибель плодів, а у 35% живих плодів відмічались різні аномалії [128]. За впливу низької концентрації Купруму встановлена достовірна відсутність ембріотоксичного та тератогенного ефектів мідного купоросу в дозах 0,5 та 0,05 мг/кг, що становить максимально переносиму добову дозу споживання Купруму та допустиму добову дозу за даними ФАО/ВООЗ [128]. Вміст Купруму в крові людини вважається відносно сталою величиною і становить 1,0 мг/л із коливаннями в межах від 0,7 до 1,7 мг/л [153]. Отже, Купрум є незамінним мікроелементом, який відіграє важливу біологічну роль в обмінних процесах організму, а також впливає на відтворювальну здатність тварин. Враховуючи складний механізм кінетики, високу біологічну активність, різноманітність властивих функцій в організмі, важливо обґрунтовано використовувати дози та сполуки Купруму як біоелемента під час вагітності, а також регламентувати і враховувати вмісту Купруму в об'єктах довкілля як екотоксиканта.

У невеликих кількостях тривалентний Хром є важливим мікроелементом, необхідним для організму людини і тварин [85, 112, 203, 469, 541]. Надходження Хрому (III) в організм має важливе значення для підтримання фізіологічного рівня глюкози в крові та метаболізму вуглеводів,

протеїнів і ліпідів [183]. Це зумовлено важливістю Хрому (III) для реалізації біологічної активності інсуліну – зв'язування гормону з мембранним рецептором та передачі регуляторного сигналу в клітину [267, 614]. Хром впливає на гомеостаз сироваткового холестеролу і попереджує його зростання зі збільшенням віку [27]. Хром впливає на обмін гліцину, серину, метіоніну і альфа-аміно-ізомасляної кислоти [166]. За його дефіциту у тварин порушується здатність включення цих амінокислот у серцевий м'яз. Істотне зниження концентрації Хрому спостерігається за вагітності, підвищених фізичних навантажень, а також у недоношених дітей та затримці розвитку.

Тривалентний Хром бере участь у регуляції передачі генетичної інформації у тварин і стабілізації структури нуклеїнових кислот [85, 674]. Йони Хрому сильніше зв'язуються з нуклеїновими кислотами, ніж іони інших металів. Відомо, що Хром акумулюється в ядрі клітини і захищає РНК від теплової денатурації. Тривалентний Хром не здатен легко перетинати клітинні мембрани і характеризується низькою реакційною активністю, що зумовлює його меншу токсичність [409]. Водночас низька реакційна активність та невисока здатність до надходження в клітини – це найважливіші біологічні особливості, які відрізняють Cr(III) від Cr(VI) [342, 492]. Шестивалентний Хром засвоюється в 3-5 разів краще, ніж трьохвалентний [166]. Хром (III) може утворювати різні координаційні комплекси, з яких основною формою є гексадентатні хелати. Абсорбція Хрому в травному каналі тварин відбувається швидко – значна частина елемента всмоктується вже за 15 хв, а виділяється з сечею за дві години після його надходження з їжею. Інтенсивність абсорбції елемента залежить від багатьох чинників, але загалом до крові надходить лише незначна частина спожитого з кормом Хрому (0,4-3,0 %). Біозасвоюванність Хрому з неорганічних сполук в шлунково-кишковому тракті складає всього 0,5-1,0 %, тоді як за надходження у вигляді комплексних органічних сполук як пікулінат, аспарагінати, зростає до 20-25%. Незалежно від шляху надходження Хрому до організму тварин, йони цього металу виявляються у

складі залізотранспортного білка трансферину, що вказує на можливість транспортування Хрому з травного тракту тварин за допомогою тих самих механізмів, що й іони Феруму [85].

За нестачі Хрому у тварин знижується толерантність до глюкози, підвищується концентрація інсуліну, глюкозурії, уповільнюється ріст, підвищується концентрація холестеролу і триацилгліцеролів, спостерігається безпліддя та порушення функцій периферичної нервової системи [29]. За визначенням Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) та згідно з висновком Міжнародного агентства з вивчення ракових захворювань (IARC), сполуки тривалентного Хрому не класифікують як канцерогенні для людини (група 3), натомість Cr(VI) віднесено до сильних токсикантів і зараховують до канцерогенів 1-ї групи [421, 623].

Результати клінічних досліджень доводять, що тривалентний Хром не проявляє несприятливих ефектів за його надходження в організм у кількостях 1 мг на добу [576]. Значна кількість Хрому акумулюється в нирках, печінці, статевих залозах, гіпофізі [617]. Встановлено, що випоювання лабораторним тваринам CrCl<sub>3</sub> у концентраціях від 1 000 до 5 000 мг/л (еквівалентно дозам від 250 до 1 250 мг/кг маси тіла) самцям і самкам миші призводило до збільшення маси сім'яників і яєчників, значного зниження плодючості та маси сім'яних везикулів у самців, зменшення маси матки у самок, збільшення кількості випадків резорбції плодів та мертвонародженого потомства [369, 679].

Сполуки Хрому (III) не спричиняють збільшення частоти генних мутацій і трансформації клітин у культивованих клітинних лініях ссавців [420], однак можуть спричинити зменшення правильності синтезу молекул ДНК [612]. У дослідженнях із застосуванням методу ДНК-комет встановлено, що хлорид Хрому (III) та CrCl<sub>3</sub> та калій дихромат спричиняють фрагментацію ДНК в ізольованих лімфоцитах периферичної крові людини [311], однак в утворенні розривів ланцюгів ДНК через утворення активних форми кисню і гідроген пероксиду задіяний виключно шестивалентний

Хром. Встановлено відмінність в реакціях організму на вплив різних сполук Хрому. Cr(III)-нікотинат і Cr(III) хлорид гексагідрат ( $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) не спричиняють пошкодження хромосом за еквівалентних нетоксичних концентрацій [616], тоді як Cr(III)-піколінат і хлорид хрому (III), виявляють мутаційну здатність у клітинах яєчника китайського хом'яка за концентрації 1 ммоль [617].

#### 1.4. Обґрунтування напрямку досліджень

Виходячи з вищенаведеного аналізу джерел літератури, можна зробити висновок, що репродуктивне здоров'я піддається впливу як шкідливих елементів із навколишнього середовища (Кадмію, Нікелю), так і впливу недостатнього надходження есенціальних мікроелементів. Така багатofакторність негативного впливу як чинників довкілля, так і дефіциту чи надлишку мікронутрієнтів негативно позначаються на відтворній здатності, а отже виникає гостра необхідність її корекції. Існує проблема з відтворювальною здатністю самок тварин, яка залежить від багатьох факторів. Тому дослідження причин фертильності повинно враховувати взаємодію найважливіших тригерів: оточуючого середовища, харчування, стресу, епігенетичних факторів, якості гамет. Сучасний стан репродукції пов'язаний з дією стресових чинників, забрудненням навколишнього середовища, що призводить до зниження чоловічої фертильності та безпліддя. Тому вивчення сперматогенезу в нормі та за впливу стресових чинників є актуальним завданням репродуктивної медицини та біотехнології, зокрема, при оптимізації умов трансплантації статевих клітин, удосконаленні методів екстракорпорального запліднення, кріоконсервації гамет.

З розвитком допоміжних репродуктивних біотехнологій, зокрема, ICSI, зростає увага до якості чоловічого генетичного матеріалу, оскільки характер патології спермійів суттєво впливає на результат запліднення та може бути успадкований нащадками [109, 361, 689]. Чисельні експериментальні



дослідження вказують, що першість за частотою порушень генетичного матеріалу порівняно з іншими клітинами належить саме дозрілим сперміям. Такі порушення можуть бути пов'язані з генними мутаціями, анеуплоїдією, епігенетичними змінами, станом компактизації хроматину і фрагментацією спермальної ДНК [69].

Найбільш важливими чинниками, які можуть призводити до порушень епігенетичного статусу, відносять харчування, стрес, стан навколишнього середовища. Саме адаптаційна здатність організму є визначальною у подальшому існуванні без порушення репродуктивної здатності і розвитку захворювань. На думку багатьох вчених, такі епігенетичні механізми як метилування та ремоделювання хроматину, які активно ініціюються у статевих клітинах, можуть призводити до епігенетичних ефектів, як зміни структурного і функціонального статусу ДНК, регулювання рівня експресії генів, стабільність хроматину [58, 216]. Зміна статусу метилування гамет призводить до формування генетичної схильності до порушень енергетичного обміну і розвитку захворювань на тлі зміненого епігенетичного статусу за антенатального розвитку. Оскільки у геномі мтДНК відсутня ефективна ДНК-репараційна система, що збільшує частоту мутацій.

Вибір теплового стресу для вивчення впливу екзогенних чинників на сперматогенез зумовлено універсальним механізмом клітинної відповіді на стрес та широким використанням гіпертермії в якості модельної біологічної системи. З літературних джерел відомо, що за дії гіпертермії не тільки підвищується експресія генів теплового шоку, але й масштабно змінюється експресія інших генів. Це гени кодують регуляторні протеїни систем пострансляційної модифікації, протеосомної деградації, сигнальної трансдукції, мембранного транспорту і загального метаболізму [89, 633]. Головна увага в дослідженнях була зосереджена на вивченні механізмів регуляції експресії транскрипційними факторами теплового шоку (HSPs) та їх функціонального значення, тоді як чіткого уявлення про зміни

транскрипційної активності клітин за дії стресу не з'ясовано. Тому вивчення причин виникнення і розвитку чоловічої безплідності є важливим і актуальним.

Практикується проведення трансплантації у поєднанні з отриманням ембріонів *in vitro* після культивуванням і заплідненням ооцитів. Незважаючи на існуючі досягнення інноваційних репродуктивної біотехнології, досі залишаються невирішеними чисельні проблеми, зокрема, повноцінність дозрівання ОКК, вплив запліднення поза організмом та подальше культивування на розвиток ембріонів, значне зниження приживлюваності розвинутих ембріонів, порівняно з отриманими *in vivo*. Пошук нових підходів до культивування ооцитів та ембріонів, розвиток репродуктивних клітинних технологій дасть змогу зберігати генетичні ресурси, швидко відновити поголів'я, регулювати відтворювальну здатність тварин, інтенсифікувати процес отримання існуючих та створення нових генотипів тварин з заданими ознаками.

Аналіз досліджень показує, що, незважаючи на розроблені різні методи і біологічно активні препарати, які регулюють і відновлюють обмінні процеси та стимулюють репродуктивну систему, проблема неплідності залишається досить актуальною. Багато вчених [189, 192, 220, 241, 247] вказують на доцільність використання у тваринництві мікроелементів, які задіяні у гормональній регуляції та інтенсифікують обмінні процеси. Актуальним напрямком сучасної репродуктивної біотехнології є розробка способів стимуляції відтворювальної здатності самиць природними фармакологічними сполуками. Серед таких стимуляторів особливе місце відводиться амінокислотам. Однією з яких є глутамінова кислота, яка володіє нейротропною дією, оскільки є одним із основних енергетичних метаболітів у нервовій тканині. Доведена також виняткова роль метіоніну у забезпеченні модифікації генної експресії, метилуванні ДНК, РНК, білків, фосфоліпідів. Багатьма дослідниками підтверджено, що метаболізм взаємодії фолатів, метильних груп і гомоцистеїну є важливими метаболічними шляхами, порушення яких різними харчовими,

гормональними та генетичними чинниками є причиною розвитку патологічних станів.

Відтак, зазначені вище проблеми вимагають комплексного дослідження й обґрунтованого практичного вирішення. Тому розробка нових негормональних, біотехнологічних препаратів, до складу яких входять органічні сполуки мікроелементів, є актуальною. Застосування мікроелементів у формі хелатних сполук є більш ефективним, оскільки вони повністю засвоюються організмом і краще проявляють стимулювальну дію на організм. У зв'язку з тим, що у літературі відсутня інформація про вплив глутаматів цинку та мангану, хром-метіонату на процес запліднення та приживлення ембріонів, було доцільним поєднати їх в одному препараті й дослідити їх вплив на відтворну функцію самок.

## РОЗДІЛ 2.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційну роботу виконано упродовж 2006-2016 років в Інституті біології тварин НААН. При проведенні досліджень були дотримані усі критерії, правила та технологічні стандарти щодо роботи з тваринами. Експерименти досліджень на тваринах проводили з урахуванням основних принципів біоетики: утримання, догляд за тваринами та їх годівлю здійснювали згідно з нормами та раціонами, рекомендованими для даного виду лабораторних тварин; евтаназію тварин проводили шляхом інгальційного хлороформного наркозу. Досліди проводили з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та принципів «Міжнародної Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986) [140], що підтверджено протоколом (№ 68 від 14.03.2018 р.) комісії з біоетичної експертизи. Лабораторні дослідження проводили на базі лабораторій Інституту біології тварин НААН, акредитованих на право проведення вимірювання біологічних та біомедичних показників.

Матеріалом для досліджень були культури клітин, ооцит-кумулясні комплекси, зиготи та експериментальні тварини (миші, щурі, кролики). Як експериментальні моделі використовували меланомні мишачі клітини лінії B16F10 і лінії NIH3T3 (ембріональні фібробласти), а також лінії LL2 (клітини карциноми легенів людини) та HEK293 (нирка ембріона людини), які культивували у середовищі Ігла у модифікації Дальбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium) з додаванням 10% ембріональної сироватки крові теляти (ФСТ) ("Sigma", США), 100 ОД/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину ("Sigma", США) або 40 мкг/мл гентаміцину ("Sigma", США) при температурі  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  у  $\text{CO}_2$ -інкубаторі в атмосфері 5%  $\text{CO}_2$ .

Клітини пересівали у пропорції 1:3 через кожні 2-3 доби для уникнення досягнення ними конфлюентного стану. Перед кожним пересівом клітини промивали однократним розчином PBS з рН 7.4. Первинну культуру клітин яйцепроводів та ендометрію тварин культивували у поживному середовищі 199 ("Sigma", США), що містило 10% ФСТ ("Sigma", США), 40 мкг/мл гентаміцину у CO<sub>2</sub>-інкубаторі за 100% вологості, 5% CO<sub>2</sub> і температури 37°C.

Перед проведенням експериментів життєздатність клітин оцінювали фарбуванням 0,1 % розчином трипанового синього ("Sigma", США). Кількість клітин підраховували у гемоцитометричній камері за допомогою світлового мікроскопу «МИКМЕД 5» фірми «ЛОМО» (Російська Федерація). Допустима кількість мертвих клітин, яка фарбується трипановим синім, не перевищувала 5 %. Модельні досліді проводили на статевозрілих лабораторних самцях та самицях мишей лінії FVB/N, самицях лінії ICR (CD-1) та C57BL/6, білих лабораторних щурах-самицях лінії Вістар, кроликах породи карпатський панон (ТзОВ «Паннон Карпатський» Закарпатська обл.).

## 2.1 Загальна схема досліджень

У дисертаційній роботі проведено 5 етапів досліджень (рис. 2.1), кожен з яких дозволив встановити особливості впливу екзогенних чинників на репродуктивну здатність, якість гамет та ембріогенез тварин.

**1-й** етап досліджень був спрямований на удосконалення окремих методичних підходів ембріональної біотехнології, що дозволяє отримувати достатню кількість ембріонів з високим імплантаційним потенціалом в умовах *in vitro* та сприяє удосконаленню технологічних елементів трансплантації. Для цього вивчали вплив різних концентрацій трансгену на розвиток мікроін'єкованих зигот *in vitro* та їх імплантаційну здатність після хірургічної трансплантації псевдовагітним самкам.

### **Етап 1**

#### **Удосконалення окремих методичних підходів ембріональної біотехнології**

- Вплив концентрацій трансгену на розвиток мікроін'єкованих зигот *in vitro* та їх імплантаційну здатність після трансплантації.
- Кріоконсервування ембріонів миші на стадії двох пронуклеусів при застосуванні методу вітрифікації.
- Дослідити можливість відновлення та розвитку деконсервованих ембріонів миші після їх культивування на фідерній культурі репродуктивних клітин.

### **Етап 2**

#### **Створення комплексної просторово-організованої клітинної системи на різних полімерних нанощарах для забезпечення дозрівання ооцитів і підвищення якості ембріонів *in vitro***

- Скринінг біосумісності нанопокриттів на клітинах ліній NIH3T3, HEK-293 та первинних епітеліальних клітинах яйцепроводів та матки кролиць.
- Дослідити ефективність покриття на основі біогелю на проліферативну та метаболічну активність клітин різних типів *in vitro*.
  - Оцінити можливість дозрівання *in vitro* ооцит-кумуляусних комплексів кролиць на просторо-організованій культуральній системі клітин ендометрію, створеній на нанопокриттях.
  - Дослідити ефект культивування 2-клітинних ембріонів миші на об'ємній культуральній системі клітин ендометрію та яйцепроводів кролиць на біогелі та нанопокритті з альбуміном.

**Рис. 2.1 Схеми досліджень (продовження на наступній сторінці).**

**Етап 3****Вплив стресових чинників на сперматогенез самців миші**

- Порівняти зміни експресії генів у соматичних та статевих клітинах миші за дії на організм теплового шоку.
- Провести тканинспецифічний аналіз експресії гена *Cideb* за впливу гіпертермії.
- Дослідити роль гена *Mdm1* у регуляції сперматогенезу миші за індукції гіпертермії. Клонування гена *Mdm1*.

**Етап 4****Вплив екзогенних чинників на оогенез та ембріогенез тварин**

- Дослідити дію кадмій хлориду, нікель хлориду та купрум хлориду на первинну культуру клітин яйцепроводу корів.
- Встановити залежність часової експозиції сполук на ріст та життєздатність ембріональних фібробластів корів.
- Визначати максимально допустиму концентрацію (МДК) купрум хлориду на клітинах яйцепроводу.

**Етап 5****Розробка біотехнологічних підходів стимуляції відтворювальної здатності самиць кроликів**

- Визначення оптимальної концентрації манган глютамату, цинк глютамату, хром метіоніну на клітинах лінії NIH3T3.
- Дослідження запліднювальної та імплантаційної здатності самиць щурів за впливу манган та цинк глютамату.
- Встановлення впливу хром-метіоніну на імплантацій здатність кролиць.
- Вплив комплексного препарату органічних сполук мікроелементів на запліднення та ранній ембріональний розвиток у кроликів.

**Рис. 2.1. Схема досліджень (продовження).**

Вивчено вплив різних кріопротекторів для кріоконсервування ембріонів миші на стадії 2-ох пронуклеусів при застосуванні методу вітрифікації мікрокрапель. Також вивчали можливість застосування культуральної системи клітин яйцепроводів для відновлення деконсервованих передімплантаційних ембріонів миші та їх подальшого розвитку до трансферабельних стадій.

## **2.2. Мікроін'єкція генетичної конструкції у пронуклеус зиготи миші**

Генетичну конструкцію, яка містила потрібний фрагмент ДНК (розміром 4300 п.н.) шляхом гідролізу плазмідного вектора *pGEMA2-LOC78634* з допомогою рестрикційних ендонуклеаз *SalI* та *SphI* та розділяли в 0,7 % агарозному гелі [261]. Для елюювання фрагментів ДНК із агарози використовували колонки *Elutip minicolumns* ("Scheicher Schuell", Німеччина). Виділений та очищений фрагмент ДНК для мікроін'єкцій розводили у буфері TE (10 мМ Тріс-НСІ рН 7,4 0,1 мМ ЕДТА). Для мікроін'єкції у пронуклеуси зигот вводили розчин ДНК у концентраціях 2 (Д1) та 4 нг/мкл (Д2) об'ємом 2 мкл.

**Вибір тварин і одержання зигот мишей.** Дослідження були проведені на білих лабораторних мишах гібридної лінії ICR (CD-1) *Albino*, FVB/N. Зиготи отримували після індукції поліовуляції шляхом внутрішньочеревного введення самкам ГСЖК (PMSG, Biowet, Drwalew Poland) у кількості 5 МО. Через 48 год самкам вводили ХГЛ ("Pregnyl, Organon", Польща) у кількості 5 МО та підсаджували їх до самців. Результативність запліднення оцінювали за наявністю копулятивних корків наступного ранку. Евтаназію тварин здійснювали через 19-20 год після ін'єкції ХГЛ, дислокацією шийних хребців. Після стимуляції 14 мишей, із 12 самок після виявлення копулятивних корків було вимито 450 зародків. Зиготи на стадії 2-ох пронуклеусів вимивали з ампульної ділянки яйцепроводів у середовищі М2 з гіалуронідазою (80 МО/мл) під бінокулярною лупою. За 2-3 хв зиготи



переносили у чашку з чистим M2 для відмивання від кумулюсних клітин. Зиготи з видимими пронуклеусами використовували для мікроін'єкції, а дегенеровані/фрагментовані виключили з експерименту [261, 554]. Отримані зиготи переносили у завчасно підготовлені краплі (500 мкл) культурального середовища KSMO ("Millipore", США) з 5 % ФСТ під мінеральним маслом та культивували у термостаті за 37°C до початку процедури мікроін'єкції.

**Метод мікроін'єкції у пронуклеус зиготи.** Для мікроін'єкції рекомбінантної ДНК використовували скляні капіляри із внутрішнім діаметром 5-10 мкм, виготовлені передднем витягуванням із капілярної трубочки з мікрофіламентом (тонкостінне тугоплавке скло, діаметром 1 мм) на мікрокузні-пулері моделі Р-97 ("Sutter instrument", США). Мікроін'єкцію здійснювали за допомогою механічного мікроманіпулятора Leica (Німеччина) [261]. Зиготи переносили у мікроін'єкційну камеру із середовищем M2 під мінеральною олією, по 15 зигот. Мікроін'єкції проводили під інвертованим мікроскопом Axiovert 35 (Німеччина) за збільшення 400×.

Кожну зиготу утримували скляною піпеткою та ін'єктували 2 пкл розчину ДНК у чоловічий пронуклеус. Про успішність процедури вказувало візуальне збільшення об'єму пронуклеуса [261, 355, 426]. Після завершення мікроін'єкцій зиготи оцінювали морфологічно, відокремлювали від лізованих зародків (дегенерованих) та продовжували культивування упродовж 3-4 діб до утворення кавітаційної порожнини (умови розвитку *in vitro*) або ж переносили у краплі M2 для безпосередньої трансплантації псевдовагітним реципієнтам (*in vivo*).

### 2.3. Трансплантація зигот

Статевозрілих самок лабораторних мишей лінії C57BL/6 вагою не менше 24 г, яких синхронізували за аналогічною схемою і спаровували з вазектомованими самцями, використовували як реципієнтів для

трансплантації. Загальну анестезію тварин проводили з використанням 2,5 % розчину авертину (Avetun, “Sigma”) з розрахунку 15 мкл на 1 г маси тіла [261]. Зиготи трансплантували в ампельну ділянку яйцепроводу самиці-реципієнта по 7-8 ембріонів у кожен яйцепровід. Після трансплантації ембріонів, кожен самку впродовж всього періоду вагітності утримували в окремій клітці.

**Аналіз зразків тканин.** Аналіз інтеграції трансгена у геном зиготи реципієнта проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). На 14-ту добу після народження у мишей відбирали зразки тканини кінчика хвоста для виділення ДНК [143] та аналізу інтеграції. Фрагмент гена *GFP* ампліфікували за допомогою *Taq*-полімерази у буфері з 2,5 мМ  $MgCl_2$  в присутності 2мМ *dNTP* та 10 пмоль кожного праймера у наступних режимах: денатурація за 94°C – 3 хвилини; далі 4 цикла за: 94°C – 20 с, 62°C – 30 с, 72°C – 35 с; 8 циклів за: 94°C – 20 с, 60°C – 30 с, 72°C – 35 с; 25 циклів за: 94°C – 20 с, 58°C – 30 с, 72°C – 35 с та останній синтез за: 72°C – 10 хв. Для ампліфікації репортерного гена *GFP* використовували праймери прямий F: 5'-CAAAGGAGGAAAGTGGCAAA-3' зворотній R: 3'-GAACCTTCAGGGTCAGCTTGC-5', підібрані за допомогою комп'ютерної програми OLIGO 4.0. Величина продукту ампліфікації становила 377 п.н [261]. Електрофоретичне розділення фрагментів ДНК проводили в горизонтальному 0,8 % агарозному гелі з бромідом етидію [126].

Кріоконсервування ембріонів проводили за допомогою надшвидкого методу твердоповерхневої вітрифікації мікрокрапель SSV як описано Dinnyes et al. [358] з деякими модифікаціями. Усі розчини готували на середовищі M2. На першому етапі ембріони на стадії двох пронуклеусів витримували впродовж 15 хв у краплі об'ємом 50 мкл еквілібраційного середовища, що складалося з 4% етиленгліколю (ЕГ) та 10% ФСТ у середовищі M2. Насичення кріопротекторами здійснювали при температурі 20-22°C. Після еквілібрації зародки переносили у краплі вітрифікаційного середовища об'ємом 20 мкл, які відрізнялися вмістом кріопротекторів. Ембріони 1-ї

дослідної групи поміщали у розчин 40 % ЕГ та 0,5 М сахарози, зародки 2-ї дослідної групи – у середовище зі вмістом 35% ЕГ, 5% ПВП (“Sigma”, США) та 0,5 М сахарози, а ембріони 3-ї дослідної групи витримували у середовищі складом 28 % ЕГ, 12 % ДМСО та 0,5 М сахарози. Зародки з об’ємом вітрифікаційного середовища 1-2 мкл наносили на попередньо охолоджену в рідкому азоті до -150-180°C металеву пластинку (10×15 см<sup>2</sup>), що відразу сприяло їх надшвидкому охолодженню. Вітрифіковані ембріони зберігали у рідкому азоті від 3-х тижнів до місяця.

Для розморожування клітини занурювали у 1 М розчин сахарози на 30 сек та переносили в 0,3 М розчин сахарози і витримували за температури 37°C впродовж 3 хв для видалення кріопротектора. Ембріони усіх груп тричі відмивали у середовищі М2 та культивували *in vitro*. Через годину після розморожування, визначали життєздатність 2-ох клітинних ембріонів за морфологічною оцінкою. До ембріонів з нормальною морфологією відносили клітини без ознак фрагментації або з незначною фрагментацією цитоплазми, з рівними, чіткими сферичними бластомерами.

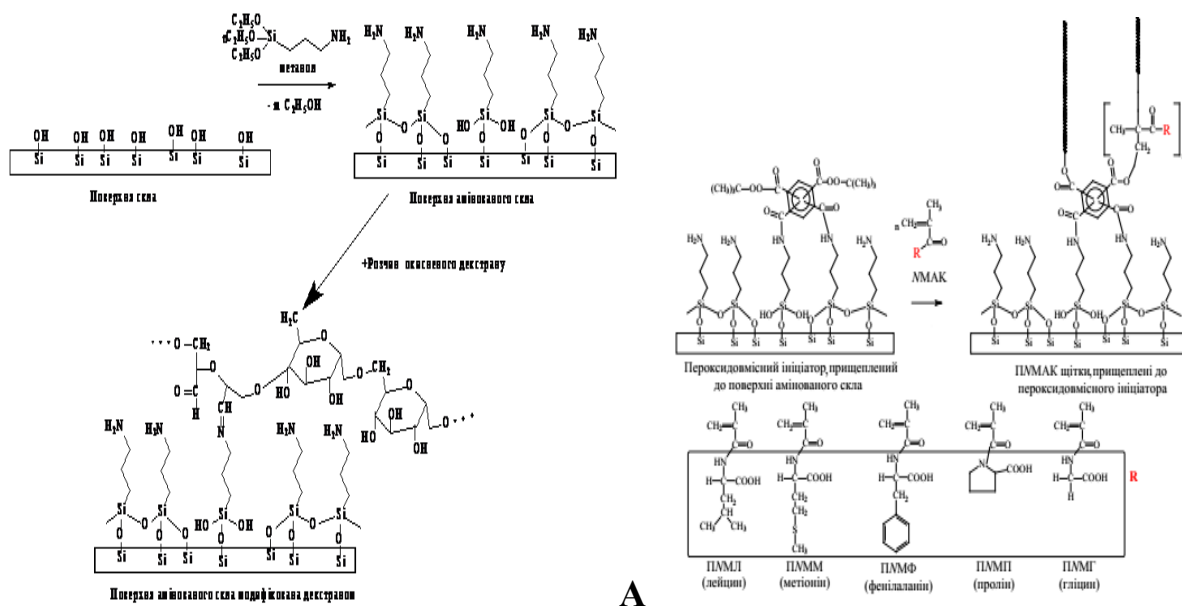
Для вивчення впливу фідерного моношару клітин яйцепроводів на розвиток деконсервованих ембріонів мишей *in vitro*, ембріони всіх груп після кріоконсервування було поділено на дві підгрупи: дослідну та контрольну. Деконсервовані ембріони дослідної групи ко-культивували на моношарі клітин яйцепроводів, тоді як при культивуванні ембріонів контрольної групи використовували культуральне середовище ДМЕМ без клітин.

#### **2.4. Аналіз біосумісності нанопокриттів на біологічних моделях**

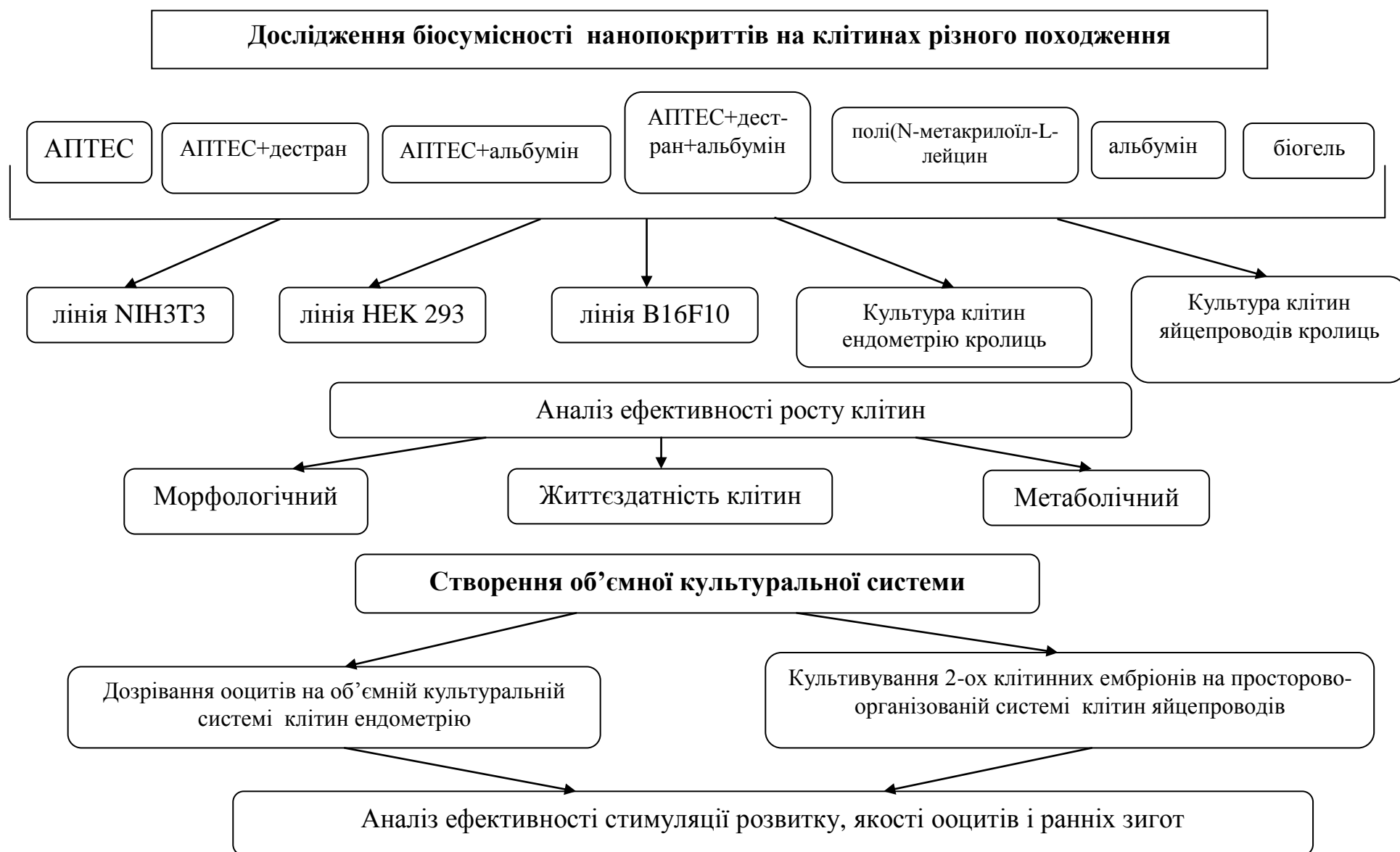
На 2-му етапі створено та апробовано комплексну просторово організовану клітинну систему на біогелі та різних полімерних наношарах, для дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК) та підвищення якості ембріонів *in vitro*. Для цього спочатку проведено скринінгові дослідження біосумісності нанопокриттів на клітинах різного походження – лінії NIH3T3

ембріональних фібробластах миші, клітинах В16F10 меланоми, клітинах НЕК-293 нирки ембріона людини та первинних епітеліальних клітинах яйцепроводів та матки кролиць. Оцінку ефективності просторово-організованої культуральної системи клітин ендометрію проводили за результатами дозрівання поза організмом ОКК кролицях на створених нанопокриттях. Також вивчали доцільність культивування 2-ох клітинних ембріонів миші на об'ємній культуральній системі клітин ендометрію та яйцепроводів кролиць на біогелі природнього походження та альбуміні, до трансферабельних стадій (рис. 2.2).

**2.4.1. Наноповерхні.** Для модифікації поверхні скла 3-амінопропіл(триетокси)силаном (АПТЕС; “Merck Chemical Co.”, Німеччина) скляні пластинки занурювали у 0,2%-й розчин цього реагента в метанолі на 24 год. Після цього молекули силану, не прищені ковалентно, можна було екстрагувати метанолом в апараті Сокслета [115, 443].



**Рис. 2.2.** Хімічна структура досліджуваних поверхонь: формування прищеплених наночарів АПТЕС і декстран (А) та модифікація поверхні полімерними щітками полі(N-метакрилоїл амінокислот) (Б). [147, 621].



**Рис. 2.3. Схема досліджень 2-го етапу**

На наступному 3-му етапі аміновані скляні пластинки занурювали на 6 год у 2%-й (за масою) розчин діальдегіддекстрану, який було отримано частковим окисненням декстрану періодатною кислотою у воді [147]. Окиснення декстрану проводили впродовж 2 год. Молекули декстрану, які не прищепились ковалентно, змивали водою в апараті Сокслета.

*Адсорбція альбуміну на модифіковані поверхні.* Для проведення адсорбції у роботі використано цитратно-фосфатний (буферний) розчин альбуміну зі значенням рН 7,4 та концентрацією альбуміну у розчині 0,2 мг/мл [147, 619].

**2.4.2. Клітини та їх культивування.** Скринінгові дослідження наноповерхонь, модифікованих різними полімерними сполуками, на клітинах лінії NIH3T3, меланомних клітинах лінії B16F10 проведено згідно таблиці 2.1.

*Таблиця 2.1.*

**Схема досліджень впливу наноповерхонь на ріст клітин**

Група	Характеристика адгезивної поверхні	Маніпуляції
Клітини лінії NIH3T3 / лінії NEK 293/ лінії B16F10		
Контроль	скло	Підрахунок кількості клітин, визначення морфології клітин, життєздатності та метаболічної активності культури на 24, 48 та 72 години культивування.
Дослідна 1	скло+АПТЕС	
Дослідна 2	скло+ АПТЕС+ декстран	
Дослідна 3	скло +АПТЕС + альбумін	
Дослідна 4	скло + альбумін	
Дослідна 5	скло + АПТЕС + декстран + альбумін	

У кожному експерименті відбирали зразки кондиційного середовища для визначення активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) та концентрацію глюкози за допомогою наборів Human (Німеччина) на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000 (“Human”, Німеччина) відповідно

до інструкцій виробників. Життєздатність клітин оцінювали за сумарною активністю мітохондріальних дегідрогеназ у МТТ-тесті.

На основі отриманих результатів щодо позитивного впливу нанопокриття з альбуміном проведено порівняльні дослідження біогелю природного походження (створеного на основі овальбуміна) та альбуміну, нанесеного на скельця методом органічного синтезу, на клітинах лінії NIH3T3 та первинній культурі клітин яйцепроводів та ендометрію кролиць (табл. 2.2).

*Таблиця 2.2.*

**Схема досліджень впливу поверхні на основі біогелю та альбуміну на ріст клітин**

Група	Характеристика адгезивної поверхні
Клітини лінії NIH3T3, культура клітин яйцепроводів та ендометрію кролиць	
Контроль	Пластикові чашки Петрі (ПЧП)
Дослідна 1	ПЧП + бігель
Дослідна 2	ПЧП + скло+альбумін

**2.4.3. Отримання ооцит-кумулюсних комплексів кроликів та їх культивування.** Для виконання досліджень було використано яєчники клінічно здорових, забитих на бойні, кролиць. Яєчники транспортували до лабораторії біотехнології відтворення впродовж однієї години за температури 38-40 С у фізіологічному розчині з додаванням 50 мкг/мл гентаміцину (“Sigma”, США) [94]. ОКК аспірували з преовуляторних фолікулів. За допомогою бінокулярної лупи (Nicon, Японія), відбирали лише ОКК відмінної чи доброї якості із багат шаровим кумулюсом, однорідною та світлою ооплазмою. Ооцити тричі відмивали в середовищі TCM 199 (“Applichem”, Німеччина) з 10 % ФСТ (“ПанЕко”, Російська Федерація),

0,2 мМ пірувату натрію (“Sigma”, США) та 50 мкг/мл гентаміцину (“Sigma”, США) [67, 262] та розділяли на групи за схемою, наведеною у табл. 2.3.

Таблиця 2.3.

**Схема досліджень впливу адгезивної поверхні на дозрівання ОКК**

Група	Характеристика поверхні
Контроль	Пластикова чашка Петрі (ПЧП) + 30 ОКК
Дослідна 1	альбумін + 30 ОКК
Дослідна 2	біогель + 30 ОКК
Дослідна 3	культура + 30 ОКК
Дослідна 4	альбумін + культура + 30 ОКК
Дослідна 5	біогель + культура + 30 ОКК

ОКК культивували в 4-х лункових планшетах (“Costar”) впродовж 24-ох год за температури 38,5°C та 5%-ному вмісту CO<sub>2</sub> в повітрі у краплях середовища 199 з 10% ЕСК (естральна сироватка крові корів), 2,5 мкг/мл ФСГ (“Sigma”, США), 1,0 мкг/мл естрадіолу (“Serva”, Німеччина), 2,5 МО/мл ЛГ (“Serva”, Німеччина), 2,0 мМ натрію пірувату (“Sigma”, США), 2,92 мМ кальцію лактату (“Sigma”, США), 40 мкг/мл гентаміцину. Після 24-ох год культивування проводили морфологічну оцінку якості ядерного дозрівання ооцитів – за наявністю полярного тільца після фарбування їх барвником Гімза (“Sigma”, США) відповідно до описаного методу [262, 383, 631].

**2.4.4. Культивування *in vitro* ембріонів миші.** Для проведення дослідів щодо культивування 2-ох клітинних ембріонів миші на об’ємній культуральній системі клітин яйцепроводів кролиць на біогелі та альбуміні, зиготи нелінійних мишей отримували після індукції суперовуляції шляхом внутрішньочеревного введення самкам 5 МО ГСЖК (PMSG, “Biowet Drwalew”, Польща). Через 48 год самкам вводили внутрішньочеревно 5 МО ХГЛ (“Pregnyl”, Organon, Польща) та підсаджували до самців.



Результативність запліднення оцінювали за наявністю копулятивних корків наступного ранку. Евтаназію тварин проводили на 2-гу добу вагітності дислокацією шийних хребців [259].

Після гормональної обробки і спаровування з самцями 8-ми самок мишей у 2 самок не було виявлено копулятивних пробок. Вимивали ембріони у 6-ти самок, від яких було отримано загалом 79 зародків, з яких 30 не запліднених та 49 ембріонів на стадії 2-клітин, у середньому 8,1 ембріона на донора (табл. 2.4).

*Таблиця 2.4.*

**Результати гормональної обробки і вимивання ембріонів самок миші**

№ п/п	Маса,г	ГСЖК 0,1 мл/вч	ХГЛ 0,1 мл/вч	Копуля- тивна пробка	Результат вимивання, ембріони	Стадія ембріонального розвитку отриманих ембріонів/ооцитів	
						незаплідне ні	2-ох клітин
1	21	+	+	+	12	5	7
2	20	+	+	-	-	-	-
3	22	+	+	+	16	7	9
4	19	+	+	+	13	4	9
5	21	+	+	+	14	6	8
6	20	+	+	-	-	-	-
7	21	+	+	+	11	4	7
8	20	+	+	+	13	4	9
Разом отримано					79	30	49

Після відмивання всіх зародків оцінювали за морфологічними ознаками та розподіляли на три групи, по 15 ембріонів у кожній групі. Для культивування ембріонів використовували середовище KSMO ("Millipore",

США) з 5 % ФСТ і клітинами яйцепроводів кролиць (з концентрацією  $0,5 \times 10^6$  клітин/мл).

Для оцінки ефективності спів-культивування ембріонів на об'ємній культуральній системі клітин яйцепроводів кролиць, створеній на основі нанопокриттів, було створено контрольну та дві дослідні групи, які відрізнялися покриттям чашок – біогелем у 1-й дослідній групі та нанесенням альбуміну на скельця методом органічного синтезу у 2-й дослідній групі (табл. 2.5).

Таблиця 2.5.

**Схема досліджень впливу просторово організованої культуральної системи клітин яйцепроводів на культивування ранніх ембріонів**

Групи	Характеристика адгезивної поверхні
Контрольна	Пластикова чашка Петрі (ПЧП) + культура клітин яйцепроводів + 15 ембріонів
Дослідна 1	ПЧП + бігель) + культура клітин яйцепроводів + 15 ембріонів
Дослідна 2	ПЧП + скло+альбумін) + культура клітин яйцепроводів + 15 ембріонів

Мишачі ембріони доброї та відмінної якості переносили у підготовлені завчасно краплі (500 мкл) культурального середовища KSMO з 5% ФСТ та клітинами яйцепроводів кролиць (з концентрацією  $0,5 \times 10^6$  клітин/мл) [259].

Культивування ембріонів проводили під мінеральним маслом у термостаті за  $37^{\circ}\text{C}$  впродовж 3-ох діб. Якість ембріонів оцінювали через кожні 24 год за морфологічними критеріями, здатністю до поновлення мітозу та частотою дроблення до стадії бластоцисти [94, 383, 392].

Наступний дослід проводили з використання біогелю природного походження та нанопокриття з альбуміном, для створення просторово організованої культуральної системи клітин ендометрію для культивування

ранніх ембріонів миші до трансферабельних стадій *in vitro*.

Для виконання дослідів отримували первинну культуру клітин ендометрію кролиць, за стандартною методикою трипсинізації клітин [94]. У експоненціальній фазі росту клітини ендометрію висівали у концентрації 0,5 млн/мл на біогель (1-ша дослідна група), на нанопокриття з альбуміном (2-га дослідна група) та на пластикову чашку (контрольна група). До кожної групи вносили по 17 ембріонів миші на стадії 2-х клітин у підготовлені завчасно краплі (500 мкл) культурального середовища KSMO з 5% ФСТ та клітинами ендометрію кролиць (з концентрацією  $0,5 \times 10^6$  клітин/мл) (табл. 2.6).

Таблиця 2.6.

**Схема дослідження впливу просторово організованої культуральної системи клітин ендометрію на культивування ранніх ембріонів**

Групи	Характеристика адгезивної поверхні
Контрольна	Пластикова чашка Петрі (ПЧП) + культура клітин ендометрію + 17 ембріонів
Дослідна 1	ПЧП + біогель + культура клітин ендометрію + 17 ембріонів
Дослідна 2	ПЧП + скло+альбумін + культура клітин ендометрію + 17 ембріонів

Культивування ембріонів проводили під мінеральним маслом у термостаті за 37°C впродовж 3-ох діб. Якість ембріонів оцінювали через кожні 24 год за морфологічними критеріями, здатністю до поновлення мітозу та частотою дроблення до стадії бластоцисти [259]. За морфологічної оцінки ембріонів враховували кількість та діаметр бластомерів, щільність міжклітинного контакту, ступінь фрагментації, прозорість і гомогенність цитоплазми, наявність цитоплазматичних вакуолей і стан *zona pellucida* [94].

У кожному експерименті було відібрано зразки кондиційного середовища, шляхом центрифугування його при 3500 об/хв. впродовж 20 хв.

Одержані зразки зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведення вимірювань окремих біохімічних показників [259]. Концентрацію глюкози та активність лактатдегідрогенази визначали за допомогою наборів Human (Німеччина) на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000 (“Human”, Німеччина) відповідно до інструкцій виробників.

## 2.5. Моделювання впливу теплового стресу на тварини

На 3-му етапі проводили експерименти щодо оцінки впливу стресових чинників на сперматогенез миші. Зокрема, як модельну систему для вивчення сперматогенезу в нормі та за впливу екзогенних чинників обрано гіпертермію, як один з верифікованих біологічних методів досліджень стресових чинників сперматогенезу. Проаналізовано зміни експресії генів у тканинах печінки та сім'яників мишей за умов теплового шоку методом ДНК-аналізу. Також досліджували роль генів *Mdm1* та *Cideb* у регуляції сперматогенезу за впливу екзогенних чинників. Зокрема, проведено тканинспецифічний аналіз експресії гену *Cideb* за умов дії на організм теплового шоку. Для з'ясування ймовірного молекулярного механізму, що опосередковує захисні ефекти сперматогенних клітин, ідентифікували альтернативний транскрипт гену *Mdm1* у сім'яниках мишей за впливу гіпертермії шляхом клонування гену.

Експеримент проводили на самцях мишей лінії FVB/N віком 3–3,5 місяці масою 28 г. Тварин утримували по 4 особи в одній клітці з підтримкою 12/12 циклового освітлення при температурі повітря  $22^{\circ}\text{C}$  і забезпечували їжею та водою у довільній кількості.

Для моделювання термічного шоку *in vivo*, мишей після анестезії 2,5% розчином Avertin (“Sigma”, США) із розрахунку 15–17 мкл/г маси, поміщали у водяну баню Poluyest20 (BIOBLOCK) з температурою води  $42^{\circ}\text{C}$  на 30 хв до рівня грудей, згідно з описаною методикою [256, 663]. Температуру води та положення тварин контролювали впродовж експерименту. Через 2, 4, 6 та

24 год після шоку проводили евтаназію мишей шляхом дислокації шийних хребців для відбору біологічного матеріалу. Для контрольної групи відбирали органи від тварин після анестезії [256].

## 2.6. Молекулярно-біологічні дослідження

**2.6.1. Виділення сумарної РНК з тканин.** Сумарну РНК виділяли за допомогою реагента «TRIZOL REAGENT» («Sigma», США) згідно інструкції виробника. Метод базується на використанні реагенту Trizol (гуанідинтіоціонат з фенолом,  $\text{pH}=4,0$ ) з додаванням хлороформу та наспупним осадженням РНК спиртом з водної фази [334]. Концентрацію виділеної РНК і наявність у ній домішків протеїнів і вуглеводів визначали за оптичною густиною розчинів при 260 нм і за співвідношенням  $A_{260}/A_{280}$  та  $A_{260}/230$ . Цілісність РНК – за співвідношенням інтенсивності смуг 28S/18S рРНК на електрофореграмі після форефу в 1 % агарозному гелі.

Усі отримані зразки РНК обробляли ДНКазою I («Roche», Німеччина) у відповідному буфері впродовж 15 хв при 37°C. Реакцію зупиняли додаванням ЕДТА («Roche», Німеччина) у кінцевій концентрації 2 мМ та інкубували впродовж 10 хв за температури 70°C. Якість РНК оцінювали електрофорезом у 1 %-му агарозному гелі в присутності етидію броміду, а також за спектральними характеристиками з використанням набору RNA 6000 Nano LabChip Kit.

**Синтез одноланцюгової комплементарної ДНК (кДНК).** Суміш для реакції зворотної транскрипції загальним об'ємом 11,5 мкл, містила 500 нг сумарної РНК, 1 мкл праймеру  $\text{oligo(dT)}_{18}$ , 1 мкл Random праймерів та деіонізованої води, очищеної від нуклеаз. Суміш інкубували 5 хв при 65°C і охолоджували на льоді. До кожного зразка додавали 5xПЛР-буфер з 15 мМ  $\text{MgCl}_2$  з Taq ДНК-полімеразою за присутності SYBR Green I (4 мкл), 5 мМ суміші дНТФ (2 мкл), 1 мкл інгібітору РНКаз RiboLock (20 одиниць/мкл). Всі компоненти реакційної суміші перемішували і витримували у ПЛР-

термоблоці впродовж 2 хв при 25°C. До кожної проби додавали 0,1 мкл (200 Од. активності) зворотної транскриптази M-MuLV RT (“Invitrogen”, США). Суміш вміщували в ампліфікатор за заданою програмою: 25°C - 10хв; 37°C - 50 хв; 70°C - 15 хв; охолодження до +4°C.

**Дизайн праймерів.** Для ампліфікації кДНК використовували праймери, які підбирали за допомогою програми Primer3 Designer.

Для перевірки та аналізу послідовностей олігонуклеотидних праймерів на специфічність користувалися базою даних NCBI та пошуковою системою BLAST SEACH ((<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Праймери були синтезовані фірмою Oligo.pl oraz.

**2.6.2. Зворотня транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР).** Реакцію проводили з використанням приладу Thermal Cycler Abbott LCX Probe System (Великобританія). До реакційної суміші ЗВ-ПЛР додавали 1-2 мкл кДНК, 3 мкл суміші 5xGreen GoTaq Reaction Buffer (“Promega”, США), 3 мкл 10 мМ суміші нуклеозидтрифосфатів (дНТФ) (100 мМ; “Fermentas”, Литова), по 0,3 мкл суміші праймерів (прямий і зворотній, 50 рМ) до гена, експресія якого досліджувалася, деіонізовану воду до загального об’єму 15 мкл.

Послідовності праймерів, які використані в дослідженні наведені в табл. 2.7. Рівень експресії нормалізували по референтними генами —домашнього господарства GAPDH (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа) та АСТВ (бета актин).

Стандартні умови проведення ПЛР становили: ампліфікація (10 хв., 50 °C; 3 хв, 94 °C; 30 сек., 94 °C; 30 сек., 58 °C) x (25-35 циклів) з наступним етапом дисоціації для визначення специфічності ампліфікованого продукту (72 °C, 10 хв., охолодження до 4 °C).

Реакції повторювали тричі для кожного гена. Базовий склад суміші для ПЛР та базові параметри протоколів відповідали рекомендаціями виробника.

Таблиця 2.7.

## Характеристика праймерів та ампліконів

Ген	Номер	Нуклеотидна послідовність праймера	Довжина продукту, п.н.
<b>ГЕНИ РЕФЕРЕНТНІ</b>			
<i>18S RNA</i>	NR_003278	L 5'-GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG-3' P 5'-GCAGCCCCGGATCTAAGG-3'	177
<i>Actb</i>	NM_007393	L 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3' P 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	234
<i>Gapdh</i>	NM_008084	L 5'-TGTCTTCACCACCATGGAGA-3' P 5'-CGGCCATCACGCCACAGCTT-3'	299
<b>ГЕНИ ДОСЛІДЖУВАНІ</b>			
<i>RIKEN cDNA 1700094 C09</i>	NM_024279	L 5'-CAAAGGAGGAAAGTGGCAAA-3' P 5'-CTAAGATGGGTGGCATGGAG-3'	312
<i>Cideb</i>	NM_009894	L 5'-TCCATGAGCTGTGATTTCCA-3' P 5'-CAGGAGTGGAGGGAAGACAG-3'	381
<i>Dazl</i>	NM_010021	L 5'-TGAAGTTGATCCAGGAGCTG-3' P 5'-CCCCCTGAGATGAGTTAGCA-3'	261
<i>Dnaja1</i>	NM_008298	L 5'-TTGCATTGTATTGCCTCAGC-3' P 5'-CATGGTTTGAGAAGGGGAAA-3'	212
<i>ErbB3</i>	NM_010153	L 5'-AGCGACACAGCCTGCTTACT-3' P 5'-CCCAGAGAAGCACTGAGGTC-3'	304
<i>Fos</i>	NM_010234	L 5'-GGAATTAACCTGGTGCTGGA-3' P 5'-CCACATGTTCGAAAGACCTCA-3'	356
<i>Hdac4</i>	NM_207225	L 5'-AGTGATGGACATCCACAGCA-3' P 5'-CGGGTAAGTTTCTTGGCTGA-3'	261
<i>Hsp90aa 1</i>	NM_010480	L 5'-GGCATGAAAATAAGGGGAAG-3' P 5'-AGGGTTGTTCTCGGGACTTT-3'	315
<i>Hsp90ab 1</i>	NM_008302	L 5'-CTGCTCTGCTCTCCTCTGGT-3' P 5'-ATTCTGTGGGAGGGGATCTT-3'	339
<i>Hspa1a</i>	NM_010479	L 5'-CCATCCAGAGACAAGCGAAG-3' P 5'-CGTTTAGACCGGCGATCAC-3'	699
<i>Mdm1</i>	NM_010785	L 5'-AGGGGTTTCAGACACTGTGG-3' P 5'-GATTGGATGCAAACACTGGA-3'	254
<i>Suv39h2</i>	NM_022724	L 5'-CTGCCCAGGATAGCATTTGTT-3' P 5'-GCAATGACTTGAGCCATGAA-3'	334

Для кожного гена підбирали оптимальні умови реакції, після встановлення градієнту температури плавлення праймерів, у разі потреби використовували різні концентрації ДНК матриці та кількість циклів ампліфікації. Кожну реакцію ампліфікації одного зразку проводили у трьох повторях.

**Електрофоретичне фракціонування фрагментів ДНК в агарозному гелі.** Електрофорез проводили у горизонтальному агарозному гелі у 0,5-кратному TBE-буферному розчині при напрузі 100-150 В. Продукти ПЛР фракціонували в 1-1,5 % агарозному гелі для розділення молекул ДНК розміром 500-7000 п.н. або 2% гель – у випадку розділення молекул ДНК менше 500 п.н. Для розділення молекул ДНК із подальшим їх елююванням використовували 1,5 % агарозний гель. Для виявлення фрагментів ДНК до гелю додавали 1 % етидій бромід (“Serva”, Німеччина). Маркерами молекулярної маси слугували pBS/Msp (при розмірі продуктів ДНК 150-709 п.н.) та  $\lambda$ -Sty (розмір продуктів становив 920-13200 п.н.). Детекцію проводили на УФ-транслюмінаторі Transilluminator.

**2.6.3. Методи молекулярного клонування .** Ампліфікацію фрагментів ДНК перед клонуванням гену *Mdm1* проводили за допомогою методу ПЛР з використанням полімерази DreamTaq DNA Polymerase (“Thermo Scientific”, США). Для цього брали 5 мкл 10х буферу DreamTaq Buffer, 5 мкл суміші 0,2 мМ дНТФ, 100 нг ДНК обробленої бісульфітом, 0,3 мкл прямого та зворотного праймерів (0,2 мкМ), 1,25 одиниць полімерази Dream Taq DNA та доводили дистильованою водою, вільною від нуклеаз до 50 мкл. Перемішували та ставили в ампліфікатор Thermal Cycler Abbott LCX Probe System (Великобританія). Було ампліфіковано два фрагменти гену *Mdm1*, послідовність праймерів яких складала:

для фрагменту *Mdm1XbaIF*

*Mdm1XbaIF* прямий праймер 5'-TCTAGAGCGCAGGGCGACAT-3'

*Mdm1R1183* зворотній праймер 5'- TCTCGGAGCTCCTTAACCTG-3'

довжина продукту – 1043 п.н.;



для фрагменту Mdm1SalI R

*Mdm1 F1051* прямий праймер 5'- GACACCAAAGGCTTGGAAAA-3'

*Mdm1SalI R* зворотній праймер 5'- GTCGACCCAGCTTGTCACTAGA-3'

довжина продукту – 1210 п.н.

Ампліфікацію проводили за наступних умов: ініціація денатурації - 95°C протягом 2 хв., денатурація - 95°C, 30 сек, 60°C - 30 сек, 72°C - 30 сек. Фінальну елонгацію здійснювали за температури 72°C впродовж 4 хв. Отриманий продукт ПЛР використовували для лігування та клонування.

**Лігування продуктів ПЛР.** Кожен з ампліфікованих фрагментів кДНК окремо було клоновано по сайтах *Xba* та *SalI* відповідно у вектор pCR II-Торо (“Invitrogen”, США) згідно рекомендацій виробника.

**Трансформація компетентних клітин *E.coli* типу TOP10 (Invitrogen).** У дослідженнях використано компетентні бактерії One Shot® *E. coli* типу TOP10 (“Invitrogen”, США). До 100 мкл розморожених на льоду компетентних бактерій *E. coli* TOP10 додавали 10-100 нг (1-10 мкл лігазної суміші) плазмідного ДНК. Клітини інкубували 30 хв на льоді та піддавали термічному шоку впродовж 5 хв у водяній бані при температурі 37°C та швидко поміщали на 5 хв на лід. До клітин додавали середовище без антибіотика LB Broth (“Sigma”, США) та інкубували в термостабілізуючій каталці при 200 об/хв впродовж 1,5 год за температури 37°C. Суспензію клітин по 100 мкл/чашку висівали на попередньо прогріте агарозне середовище (1,5 % агар в LB Broth, “Sigma”, США) з ампіциліном та інкубували за температури 37°C 12-14 год.

**Виділення плазмідної ДНК.** Кожну колонію бактерій з агарозної чашки та переносили до пробірки з 1,5 мл середовища LB Broth (“Sigma”, США) з ампіциліном в концентрації 50-100 мкл/мл та інкубували 18 год за температури 37°C у термостаті з перемішуванням (180-200 об/хв). Бактерійну культуру переносили до пробірки Еппендорф, центрифугували при 10000 g 2 хв., відбирали надосадову рідину та ресуспендували осад в 100 мкл буферу STET з 10 мкл розчину лізозиму в концентрації 0,9 мг/мл та інкубували 5 хв

за кімнатної температури. Лізовані бактерії впродовж 50 сек витримували при 96°C в термоблоці, відразу охолоджували в льоді та центрифугували 15 хв при 14000 g. Осад видаляли, а до надосадової рідини додавали рівний об'єм ізопропанолу та інкубували 10-15 хв при -20°C. Після центрифугування при 14000 g 5 хв, осад висушували та розчиняли в 100 мкл буферу TE з додаванням РНази А в концентрації 10 мл/мл та інкубували 10-20 хвилин при кімнатній температурі (10-20 хв 37°C). Після інкубації здійснювали депротейнізацію матеріалу ядер шляхом послідовної екстракції фенолом (рН 8,0). До кожного зразка додавали рівний об'єм насиченого водою фенолу (НВ), перемішували, центрифугували та переносили верхню водну фазу до нової пробірки Еппендорф. З надосадової рідини виділяли ДНК, осад промивали 70% етанолом, висушували та розчиняли в 20 мкл H<sub>2</sub>O/DEPC.

**Рестрикційний аналіз.** Реакції рестрикції плазмід рестриктазами проводили згідно рекомендаціям фірм-виробника “Promega” (США) і “Fermentas” (Литовська Республіка). Для кожного ензиму підбирали оптимальний буфер, температуру і час, при яких їхня активність була найвищою. Для повного розщеплення ДНК застосовували 1-2 кратну кількість ензиму на 1 мкл плазмідної ДНК. Отримані продукти реакції аналізували методом електрофорезу в агарозному гелі з вмістом бромистого етидію (0,5 мкл/мл гелю) у буфері 0,5xTBE.

**Лігування.** Для побудови рекомбінантної плазмиди pMEV-2HAMdm1 отримані вектор pCR II-ТороMdm1XbaI обробляли ендонуклеазами рестрикції EcoRI і XbaI, а плазмиду pCR II-ТороMdm SalI - рестриктазами EcoRI та SalI. Вектор pMEV-2HA (“Biomux Technology”, США) розщеплювали ендонуклеазами рекстрикції XbaI та SalI та проводили лігування з елюйованими фрагментами, що містили ген *Mdm1*, з'єднуючи їх через EcoRI.

Для лігування фрагментів у вектор pMEV-2HA готували реакційну суміш, яка містила 3 мкл розчину вектора pMEV-2HA, 2 мкл 10x лігувального буфера, по 5 мкл кожної вставки, 1 мкл T4 DNA Ligase

(“Roshe”, Німеччина). Об'єм суміші доводили водою, вільною від нуклеаз до 20 мкл. Отриману суміш інкубували 1 год за температури 37°C. Для трансформації клітин використовували 2,5 мкл реакційної суміші.

Для проведення трансфекції клітин здійснено переклонування рекомбінантної плазмиди рMEV-2HAMdm1 до вектору рLNCX2 (“Clontech”, США), які попередньо обробляли ендонуклеазами рестрикції Hind III та Not I. Для запобігання самолігуванню плазмиди, вектор рLNCX2 по HindIII та NotI, обробляли фосфатазою SAP (“Mannheim GmbH”, Німеччина) впродовж 15 хв за температури 37°C. Подальшу дезактивацію проводили при 65°C впродовж 15 хв.

Реакцію лігування на ‘липкі кінці’ проводили з використанням ДНК-лігази фага T4 у T4 10x DNA буфері (“Roshe”, Німеччина). До складу 15 мкл суміші для лігації входило 0,3 мкл вектора рLCNX2 (форма лінійна після травлення ендонуклеазами HindIII та NotI) і 0,9 мкл вставки (фрагмент рMEV-2HAMdm1 Mdm1 по HindIII та NotI). Інкубацію проводили за кімнатної температури впродовж 1 год. Дезактивація лігування проводили за температури 65°C при 10-15 хв. Трансформацію клітин *E. coli* штаму Match1, Stb12 (“Clontech”, США) плазмідною ДНК та приготування компетентних клітин здійснювали як описано Маніатісом та співав. [126]. Штами *E. coli* з плазмідами зберігали за температури -70°C у середовищі 2×YT з кріопротектором (30% гліцерину). Виділення плазмідної ДНК із *E. coli* проводили методом лужного лізису [465] з модифікаціями.

**Ізоляція ДНК методом електроелеюції.** Ізоляцію фрагментів ДНК з 1% агарозного гелю проводили методом електроелеюції. По завершенню розділення електрофоретичних продуктів розщеплення, під УФ світлом скальпелем вирізали між потрібними проміжками гелю кишеньки, в які поміщаючи плівку для діалізу та заливали буфер для електрофорезу 0,5x TBE. Рівень буферу в апараті до електрофорезу був на рівні гелю. При подальшому електрофорезі, ДНК мігрує до кишеньки. Вміст ДНК в буфері переносили до пробірки Еппендорф.

**Виділення ДНК (лізис за лужних умов).** Отримане методом електроелекції ДНК виділяли в 3М ацетаті натрію (pH = 5,3) із додаванням 10% об'єму пробірки та 96% холодного етанолу в кількості 2-х об'ємів від початкової кількості проби. Суміш інкубували 20 хв за температури - 20°C та центрифугували впродовж 5 хв при 13000 g. Осад ДНК отримували додаванням 2-х об'ємів холодного 96 % етилового спирту, з наступним центрифугуванням та промиванням 70 % етиловим спиртом. Отриманий осад підсушували та розчиняли в 20 мкл H<sub>2</sub>O/DEPC. Концентрацію ДНК вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 260 нм. ДНК очищали на колонковій афінній хроматографії (DNA-Plasmid purification Mini/Maxi kit, QIAfilter Cartridges, "Qiagen", Німеччина) та визначали концентрацію ДНК на спектрофотометрі NanoDrop (ND-1000).

**2.6.4. Тимчасова трансфекція клітин.** Для трансфекції використовували пакувальні клітини RetroPackPT67, які попередньо культивували у середовищі ДМЕМ ("Sigma", США) зі вмістом 10% ембріональної сироватки крові теляти ("Sigma", США), 100 од/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину ("Sigma", США) за 37°C в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> впродовж 24 год до досягнення 60-80 % конfluентності моношару. Клітини за 24 год до трансфекції пересаджували на 6-ти лунковий планшет у кількості 100 000 клітин/чашку.

Тимчасову трансфекцію клітин проводили із використанням реагенту Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 ("Invitrogen", США) згідно з протоколом виробника. Для трансфекції 4,2 мкл плазмідної ДНК (4 нг) додавали до 250 мкл середовища ДМЕМ без сироватки, окремо розчиняли 5 мкл Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 у 250 мкл середовища ДМЕМ без сироватки крові. Кожну суміш інкубували впродовж 5 хв за кімнатної температури, об'єднували та інкубували ще 20 хв для формування ДНК-ліпосомних комплексів. З чашки з клітинами відбирали середовище та додавали суміш для трансфекції та культуральне середовище без сироватки крові, обережно

ресуспендували середовище для рівномірного розчинення комплексу. Клітини інкубували 6 год при 37°C у CO<sub>2</sub>-інкубаторі. Потім ліпосомальний препарат відбирали та додавали до клітин середовище із сироваткою крові і культивували впродовж 48 год. Зібране після трансфекції клітин кондиційне середовище зберігали у пробірках при -70°C у холодильній камері. Контролем слугували оброблені тільки трансфекційним агентом (Контроль негативний). Експресію рекомбінантних протеїнів у клітинах аналізували методом Вестерн-блот аналізу.

**2.6.5. Вестерн-блот аналіз протеїнів клітин.** Для приготування лізатів, клітини через 48 год після трансфекції двічі відмивали у розчині ФСБ та лізували у буфері у 150 мкл лізис-буфері, що містив 1xPBS, 0,5 % SDS, 0,1 % SDC, 1 % Nonidet P-40, PMSF 1 мМ, 50 мМ флуорид натрію (NaF) та суміш інгібіторів протеаз виробництва “Roche” (Німеччина) за 4°C впродовж 20 хв. Надосадову рідину відбирали після центрифугування при 14000g впродовж 20 хв. Визначали концентрацію протеїну за методом Бредфорд із використанням Bradford Reagent (“Bio-Rad”, США) і БСА (“Sigma”, США) як стандарту реагента. Протеїни розділяли у 10%-у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію та перносили на мембрану нітроцелюлозну мембрану (Whatman), використовуючи напівсуху систему перенесення. Після здійснення переносу мембрану спочатку блокували 5%-м розчином обезжиреного молока в TPBS (буфер PBS з 0,1 % Твін-20, 250 мМ Tris-HCl, pH 7.5) впродовж 60 хв. Для детекції протеїну Mdm1 використовували специфічні антитіла (“Aviva Systems Biology”, Cat. No OAAF07930) у розведенні 1:1000. Вторинні антитіла (“IgG, Santa Cruz Biotechnology”, США), пов’язані з пероксидазою, використовували у розведенні 1:5000. Комплекс з антитілами виявляли за допомогою хемілюмінесцентних реагентів посиленої чутливості (“Amersham Pharmacia Biotech”, США), як описано раніше [517].

На **4-му етапі** досліджено вплив екологічних чинників на перебіг гамето- та ембріогенезу самиць тварин. При проведенні скринінгових

досліджень *in vitro* у 1-й серії дослідів спочатку порівнювали потенційну токсичність кадмій хлориду, нікель хлориду, купрум хлориду на первинних культурах клітин яйцепроводів корів та визначали часову залежність впливу сполук кадмій хлориду та нікель хлориду на первинних ембріональних фібробластах корів.

Експерименти проводили на первинних культурах клітин репродуктивних органів тварин, виділених з яйцепроводів та матки кролиць та корів із забійного матеріалу. Первинну культуру клітин отримували в асептичних умовах у лабораторії Інституту біології тварин НААН шляхом механічного подрібнення тканини, відмиванням від крові розчином Хенкса з додаванням гентаміцину (10 мкг/мл), ензимною обробкою 0,25% розчином трипсину (“Serva”, Німеччина) з ЕДТА (1:1), інкубуванням впродовж 25 хв при 37°C, подальшим інактивуванням трипсину 0,4 мг/л БСА (“Sigma”, США) та центрифугуванням 10 хв при 1000 об/хв [94, 121, 194, 205, 207].

Для оцінки цитотоксичної дії сполук, клітини у концентрації  $1,2 \times 10^6$  клітин/мл висаджували у 6-лункові планшети. Через 24 год після посадки клітин додавали сполуки в культуральне середовище у вигляді водного розчину у досліджуваних концентраціях: кадмій хлориду у концентрації 50 мкг/мл та 100 мкг/мл, нікель хлориду у концентрації 100 та 150 мкг/мл, купрум хлориду у концентрації 100 та 200 мкг/мл. Культивування клітин проводили впродовж 3 діб у присутності сполук металів. Через кожні 24 год проводили оцінку росту клітин та відбирали кондиційне середовище для визначення загального протеїну, концентрацію глюкози, вміст кальцію та фосфору, активність лужної фосфатази – за допомогою наборів Human (Німеччина) на біохімічному аналізаторі Numalyzer 2000 (“Human”, Німеччина).

Для визначення впливу часової експозиції сполуки на ріст клітин, водний розчин кадмію хлориду в концентрації 50 мкг/мл, нікель хлориду в концентрації 100 мкг/мл одноразово вносили у культуральне середовище з клітинами ембріонального фібробласта корів дослідних груп та інкубували за присутності сполуки впродовж 3 год (1 дослідна група), 6 год (2 дослідна група), 24 год

(3 дослідна група), 48 год (4 дослідна група) та 72 год (5 дослідна група). Через зазначені проміжки часу (3, 6, 24, 48 та 72 год) проводили заміну середовища на чисте і продовжували культивування до 72 год [263]. Клітини, які не зазнавали впливу сполуки, були взяті за контроль. Окрім того, на культурі клітин яйцепроводів визначали показник максимально допустимої концентрації (МДК) купрум хлориду після дослідження різної експозиції сполуки (0,01; 0,05; 0,1; 100 та 200 мкг/мл). Для визначення МДК клітини яйцепроводів висівали у 96-лункові культуральні планшети. На добре сформований моношар клітин вносили купрум хлорид у варіюючих концентраціях. Для кожного розведення використовували по 10 лунок. Кожні 24 год після експозиції сполуки за допомогою мікроскопу оцінювали стан моношару та морфологію клітин, дегенерацію моношару у порівнянні з інтактним контролем культур клітин. За МДК приймали концентрацію купрум хлориду за якої не виникали видимі дегенеративні зміни клітин порівняно з контролем.

## 2.7. Дослідження запліднюючої та імплантаційної здатності тварин

На **5-му етапі** проведено комплекс досліджень щодо підвищення рівня імплантації за впливу біогенних мікроелементів (рис. 2.4).

*Таблиця 2.8.*

### Схема дослідження проліферації клітин ліній NIH3T3 та LL2 за введення до культурального середовища сполук мангану

Групи	Характеристика груп
Клітини ліній NIH3T3 та LL2	
Контрольна	ОС (основне середовище)
Дослідна 1	ОС + мангану глутамат (0,08 мкг/мл)
Дослідна 2	ОС + мангану глутамат (0,16 мкг/мл)
Дослідна 3	ОС + мангану глутамат (0,32 мкг/мл)
Дослідна 4	ОС + мангану сульфат (0,1 мкг/мл)

У 1-й серії дослідів проводили визначення безпечності та встановлення оптимальної концентрації органічних сполук глутамату мангану та цинку, хром метіоніну (у концентрації 0,030; 0,050 та 0,100 мкг/мл) на клітинах лінії NIH3T3 (мишачі ембріональні фібробласти) і лінії LL2 (клітини карциноми легенів людини) та первинній культурі клітин ендометрію кролиць за системними біомаркерами – динаміки проліферації та біохімічними показниками метаболічної активності культури (життєздатність за МТТ-тестом та активністю ЛДГ) [467]. У 1-й серії дослідів скринінгові дослідження манган глутамату проведено на клітинах ліній NIH3T3 та LL2 за визначенням проліферативної та метаболічної активності клітин (табл. 2.8).





**Рис. 2.4** Схеми досліджень 5-го етапу

Визначення оптимальної концентрації цинку глутамату проводили на культурі клітин лінії NIH3T3 за схемою, представленою у табл. 2.9.

Таблиця 2.9.

**Схема дослідження проліферативного росту культури клітин ліній NIH3T3 за введення сполук цинку в культуральне середовище**

Групи	Характеристика груп	Маніпуляції
Клітини ліній NIH3T3		
Контрольна	ОС (основне середовище)	Підрахунок росту клітин на 24, 48 та 72 год культивування, визначення життєздатності клітин (МТТ-тест) та активності ЛДГ
Дослідна 1	ОС + цинку глутамат (0,1 мкг/мл)	
Дослідна 2	ОС + цинку глутамат (0,15 мкг/мл)	
Дослідна 3	ОС + цинку глутамат (0,25 мкг/мл)	
Дослідна 4	ОС + цинку сульфат (0,1 мкг/мл)	

Культивування ембріональних фібробластів ліній NIH3T3 та клітин лінії LL2 було проводили у середовищі ДМЕМ з додаванням 10% ФСТ впродовж 72 год за температури 38,5°C та максимальній вологості в CO<sub>2</sub>-інкубаторі. Морфологію клітин аналізували загальноприйнятими методами світлової мікроскопії; життєздатність клітин за умови фарбування трипановим синій [46]. Зміну метаболічного стану клітин оцінювали за активністю в кондиційному середовищі цитозольної ЛДГ та за сумарною активністю мітохондріальних дегідрогеназ у МТТ-тесті.

**МТТ-тест.** МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід ("Sigma Aldrich", США) – це тетразолієва сіль, яку використовують для проведення колориметричного тесту, що дозволяє оцінити метаболічну активність, а отже і життєздатність клітин. Клітини висівали в 24-лункові пластикові культуральні планшети у концентрації 30 000 клітин в одну лунку. Через 24 год додавали досліджувані сполуки у різних концентраціях та інкубували протягом 72 год. Аналіз життєздатності клітин за МТТ-тестом

проводили згідно з рекомендаціями виробника. Оптичну густину кінцевого забарвленого продукту вимірювали при  $\lambda=570$  нм (OD570) на спектрофотометрі. Кількість життєздатних необроблених клітин приймали за 100%.

У 2-й серії дослідів проводили експерименти у системі *in vivo* на модельних тваринах: для встановлення запліднюючої та імплантаційної здатності за впливу мангану та цинку глутаматів, селеніту натрію у ліпосомальній формі використовували самиць щурів лінії Wistar; вплив хром-метіоніну на запліднення та ранній ембріональний розвиток, а також підвищення репродуктивної функції за впливу комплексного препарату органічних та мінеральних сполук мікроелементів досліджували на кролицях.

У роботі використано підібраних методом аналогів статевозрілих самицях щурів лінії Вістар у віці 2,5-3 місяці вагою 180-200 г. На підготовчому етапі перед проведенням експерименту досліджували естральний цикл самиць методом піхвових мазків [243, 265]. Самок зі стійким ритмом естрального циклу розділяли на 5 груп по 10 тварин у кожній: 1 група – контрольна, тваринам підшкірно вводили ліпосомальну емульсію, 2 група – тваринам підшкірно вводили глутамат мангану у формі ліпосомально емульсії у дозі 2,75 мг/кг за 7 діб до запліднення; 3 група – тваринам вводили мангану глутамат у дозі 2,75 мг/кг при заплідненні; 4 група – самицям підшкірно вводили цинку глутамат у ліпосомальній формі у дозі 3 мг/кг за 7 діб до запліднення; 5 група – самицям підшкірно вводили цинку глутамат у ліпосомальній формі у дозі 3 мг/кг при заплідненні.

Тваринам усіх груп внутрішньом'язово вводили 20 МО ФСГ ("Фоллимаг", Моссагровет, Російська Федерація), та через 48 год - 30 МО ХГЛ ("Прегніл", Organon, Нідерланди). Підсадку самців проводили через 2-3 год після введення ХГЛ. Самиць усіх груп на стадіях проєструс-єструс парували з самцями у співвідношенні 2:1. Першу добу вагітності визначали за наявністю сперматозоїдів у піхвових мазках. Результати оцінювали після евтаназії самиць під ефірним наркозом на 14-ту добу вагітності. Після вилучення матки

з яєчниками, визначали кількість жовтих тіл у яєчниках, місць імплантацій, кількість живих плодів та кількості резорбцій у матці [265]. Доімплантаційну летальність визначали за різницею між кількістю жовтих тіл в яєчниках і кількістю місць імплантацій в матці; постімплантаційну смертність – за різницею між кількістю місць імплантацій і кількістю живих плодів [18, 74, 135, 265]. Для виявлення морфологічних змін визначили абсолютну масу яєчників та розраховували відносну масу яєчників за формулою  $M_{\text{відн}} = M_{\text{абс}} / M_{\text{твар}} \times 100\%$ , де  $M_{\text{відн}}$  – відносна маса яєчника, мг,  $M_{\text{абс}}$  – абсолютна маса яєчника, мг,  $M_{\text{твар}}$  – маса тварин, мг. Також, обраховували Індекс впливу (І) досліджуваної сполуки на масометричні показники яєчників згідно [150] за формулою  $I = M_{\text{досл}} / M_{\text{контр}}$ . Ліпідний спектр крові вивчали за вмістом загального холестеролу (ХС), триацилгліцеролів (ТГ), ліпопротеїнів низької (ЛПНГ) та високої густини (ЛПВГ).

При проведенні дослідів з метою розробки препаратів пролонгованої дії, самицям щурів вводили селеніт натрію у ліпосомальній формі підшкірно у концентрації 75 мкг/кг та 2 % розчину синьої туші на 1 мл. Для досліджень підібрано 3 групи тварин по 5 голів в кожній. Перша дослідна група отримувала підшкірно селенвмісний препарат тричі до запліднення, друга – 5 разів: 3 рази до запліднення та 2 рази після запліднення, третя група була контрольною. Рівень запліднюваності щурів вираховували за формулою: кількість спарованих/кількість запліднених  $\times 100\%$ .

**Вплив хром-метіоніну на імплантацій здатність кролиць.** Дослідження були проведені на кролицях породи «Карпатський панон», підібраних по принципу аналогів і розділених на 3 групи по 4 голови в кожній. Кролиці контрольної групи утримувались на основному раціоні (ОР) господарства. Тваринам дослідних груп впродовж 6-ти тижнів до осіменіння додатково до основного раціону додавали хром-метіонін у дозі 25 мкг/голову на добу (1-ша дослідна група) та 50 мкг/голову на добу – тваринам другої дослідної групи. На 14-ту добу сукрільності після забію тварин відбирали

зразки крові і тканини для проведення біохімічних та гематологічних досліджень.

**Вивчення впливу комплексного препарату на запліднення та ранній ембріональний розвиток у кролів.** Препарат «Ліпоорганік», розроблений в Інституті біології тварин НААН (ТУ У 21.2-30995014-00:2018; Пат. № UA 105740 U), містить у своєму складі органічні сполуки мікроелементів – цинку глутамат, мангану глутамат, хром-метіонін, мінеральну сполуку - селеніт натрію та вітаміни А, Д<sub>3</sub>, Е у формі ліпосомальної емульсії.

Для розробки ліпосомального препарату використовували компоненти, які поетапно досліджували на культурах клітин та самицях модельних тварин у визначених дозах. При виготовленні досліджуваного препарату використовували поверхнево активну речовину твін і ефірний розчин соєвого L- $\alpha$ -лецитину, який містив 17 % фосфатидилхоліну [221, 245, 266]. Суміш гомогенізували до однорідності суспензії впродовж 2–3 хв на ультразвуковому диспергаторі УЗДН-1 з силою струму 8 мА і частотою 22 кГц.

Для виконання роботи підбирали кролиць породи «Карпатський паннон» 3-3,3 місячного віку, вагою 3,2-3,5 кг, за принципом аналогів. Кролиці утримувались в окремих клітках та стандартному раціоні господарства. Тварин поділяли на 3 групи: контрольну та дві дослідні по 10 голів в кожній. Тваринам 1-ої дослідної групи за 14 діб до осіменіння підшкірно вводили ліпосомальний препарат у дозі 1,5 мл/кг, а кролицям 2-ої дослідної групи - у дозі 1,5 мл/кг під час осіменіння. Для синхронізації статевого циклу тваринам усіх дослідних груп внутрішньом'язово вводили 40 ІО ГСЖК (Фолігон, «Інтервет», Голландія). Через 28 год усіх тварин осіменяли свіжоодержаною спермою кролів у концентрації  $10 \times 10^6$  спермійів/0,5 мл/самку. Одразу після осіменіння овуляцію індукували аналогом гонадотропін-рилізінг гормону (Фертагіл, «Інтервет», Голландія) в дозі 0,2 мл/самку [196].

Таблиця 2.10.

**Схема дослідження впливу комплексного препарату «Ліпоорганік» на запліднення та ранній ембріональний розвиток у кролиць**

Група	Схема введення		Маніпуляції
	до осіменіння	при осіменінні	
Контрольна	-	-	Морфометрична оцінка репродуктивних органів кролиць
Дослідна 1	1,5 мл препарату/кг	-	Визначення гематологічних та біохімічних показників
Дослідна 2	-	1,5 мл препарату/кг	Ліпідний спектр крові (ХС, ТГ, ЛПНЩ, ЛПВЩ) Показники ПОЛ та активність АОС

На 14-ту добу сукрільності проводили забій кролиць та відбирали зразки крові і тканини для проведення біохімічних та гематологічних досліджень. Ефективність дії ліпосомального препарату на відтворювальну функцію кролиць встановлювали після проведення морфометричної оцінки репродуктивних органів (маси яєчників) і візуального підрахунку кількості жовтих тіл вагітності, місць імплантації, кількості живих плодів та кількості резорбції.

**Вплив різних способів додавання до гранульованого комбікорму комплексного препарату «Ліпооорганік» на інтенсифікацію репродуктивної функції у кролиць.** Дослід проведено на кролицях породи «Карпатський паннон», яких було відібрано за принципом аналогів і розділено на 3 групи по 10 голів в кожній. Всі кролиці утримувались на основному раціоні (ОР) господарства.

Таблиця 2.11.

**Схема дослідження впливу різних способів введення препарату  
«Ліпоорганік»**

Групи	Схема введення	
	14 діб до осіменіння	при осіменінні
Контроль	-	-
Дослідна 1	5 г/добу гранульованого комбікорму (вміст ліпосомального препарату складав 0,3 мл /кг)	-
Дослідна 2	5 г /добу гранульованого комбікорму (вміст ліпосомального препарату складав 0,3 мл /кг)	1,5 мл/кг підшкірно

Тваринам першої групи з метою підвищення запліднюваності за 14 діб до осіменіння згодовували 5 г гранульованого комбікорму в добу, до складу якого було введено ліпосомальний препарат у дозі 0,3 мл/кг, тоді як кролицям другої групи окрім згодовування аналогічного комбікорму при осіменінні додатково підшкірно вводили ліпосомальний препарат «Ліпоорганік» у дозі 1,5 мл/кг. На 14 добу сукрільності, після забою кролиць відбирали зразки крові та тканини для проведення біохімічних і гематологічних досліджень.

Після завершення виконання дисертаційної роботи була проведена виробнича перевірка препарату «Ліпоорганік» у господарстві ТзОВ «Паннон Карпатський» (Додаток Е, З), отримано патент України (Додаток К) та технічні умови (Додаток Д).

## 2.8. Біохімічні методи досліджень

Матеріалом для досліджень слугувала кров та тканини (матка, яєчники, яйцепроводи, печінка, плазма), отримані після евтаназії дослідних тварин. Відібрані тканини охолоджували у фізіологічному розчині, підсушували фільтрувальним папером, зважували та заморожували у рідкому азоті для подальших досліджень. Оцінку показників антиоксидантної системи проводили в гомогенатах тканин, які отримували шляхом розтирання наважки у ступці з додаванням буферу для гомогенізації. Для проведення біохімічних досліджень з крайової вени вуха кожної дослідної тварини відібрали зразки крові у попередньо підготовлені марковані пробірки. Кров відбирали у стерильні пробірки із ЕДТА (Venosafe, Terumo Europe NV, Бельгія) для визначення наступних гематологічних показників: концентрацію гемоглобіну, величину гематокриту, кількість еритроцитів, коливання розмірів еритроцитів, середній об'єм еритроцитів, середній вміст гемоглобіну в еритроцитах, середню концентрацію гемоглобіну в еритроцитах, кількість лейкоцитів на гематологічному аналізаторі Mythic 18 Vet (Orphee, Швейцарія) відповідно до інструкції щодо використання апарату [196].

Відсоткове співвідношення лейкоцитів визначали підрахунком кількості лімфоцитів, моноцитів та гранулоцитів у мазках крові попередньо зафарбованих методом Романовського-Гімза. Відсоткове співвідношення лейкоцитів визначали після підрахунку 100 клітин. Кров для отримання сироватки відбирали в пробірки без коагулянту ЕДТА із силіконовим гелем (Venosafe, Terumo Europe NV, Бельгія). Після забору зразків, пробірки залишали при кімнатній температурі впродовж 30-ти хв для згортання крові, після центрифугували при 1500 g впродовж 15-ти хв [179, 196]. Відібрану сироватку використовували для визначення холестеролу, триацилгліцеролів та ЛПНЩ і ЛПВЩ за допомогою біохімічного аналізатора Humalyzer 2000. Кров для отримання плазми відбирали у стерильні пробірки із гепарином (Venosafe, Terumo Europe NV, Бельгія) та центрифугували при 1500 g впродовж 15 хв.



Визначення активності лужної фосфатази (КФ 3.1.3.1), аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1), лактатдегідрогенази (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), гамаглутаматтрансферази (КФ 2.3.2.2), вмісту загального протеїну, концентрації сечовини та глюкози, вмісту загального холестеролу, триацилгліцеролів, ліпопротеїнів низької (ЛПНГ) та високої густини (ЛПВГ) проводили уніфікованими лабораторними методами з використанням наборів реактивів фірми “Human” (Німеччина) на автоматичному біохімічному аналізаторі «Humalyzer 2000» (Німеччина) за зміною оптичної щільності реакційних середовищ. Коефіцієнт Де Рітиса вираховували за співвідношенням активності АлАТ/АсАТ [88, 134]. Співвідношення фракцій глобулінів ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  і  $\gamma$ ) вимірювали за допомогою електрофорезу на ацетат целюлозних пластинках [196].

Вміст дієнових кон'югатів у плазмі крові визначали за методом, описаним Стальною І. Д., 1977 [208]. Принцип методу полягає в тому, що процес перекисного окиснення поліненасичених жирних кислот супроводжується перегрупуванням подвійних зв'язків й утворенням системи спарених дієнових структур, які мають максимум поглинання при довжині хвилі 233 нм [87]. Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів проводили за реакцією з тіоціанатом амонію за методом, описаним Романовим Л.А. і Стальною І.Д. [175, 209]. Інтенсивність забарвлення визначали колориметрично при довжині хвилі 480 нм. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів проводили шляхом інкубації проб з тіобарбітуровою кислотою, екстракції продуктів реакції бутанолом і спектрофотометричної детекції забарвленого комплексу при довжині хвилі 535 нм та 580 нм [43, 88, 171]. Маркерами стану пероксидації слугували показники окисної модифікації протеїнів (ОМП). Метод ґрунтується на принципі взаємодії окисних амінокислотних залишків білків із 2,4-динітрофенілгідразоном (2,4-ДФГ) з утворенням похідних 2,4-динітрофенілгідразону (за Дубініною О. Є. та співавт., 1995) [42, 71]. Інтенсивність окиснення визначали за утворенням альдегідних і

кетонних груп у радикалах залишків аліфатичних амінокислот білків у сироватці крові та гомогенатах тканин. Альдегідо- і кетонпохідні нейтрального характеру (ОМП370) реєстрували за оптичною густиною при 370 нм, основного (ОМП430) — при 430 нм [470, 594].

Дослідження активності ензимів антиоксидантної системи: супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) активність визначали за рівнем інгібування ензимом процесу відновлення нітросинього тетразолію за наявності NADH і феназинметасульфату, як описано Дубініною Е. і співавторами [42, 71].

Каталазу (КФ 1.11.1.6) активність визначали за здатністю пероксиду гідрогену утворювати стійкий комплекс із молібдатом амонію, інтенсивність забарвлення якого вимірювали при  $\lambda=410$  нм [102]. Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) визначали допомогою методу, описаного Моїном В.М. та співав. [139, 493] з використанням гідропероксид-трет-бутилу (ГПТБ) як субстрату.

Концентрацію церулоплазміну (ЦП, КФ 1.16.3.1) у сироватці крові визначали за модифікованим методом Равина. Метод базується на реєстрації забарвлених продуктів, утворених внаслідок ензиматичного окиснення ЦП хлориду *p*-фенілендіаміном (довжина хвилі 540 нм) [41, 119].

## 2.9. Статистичний аналіз даних

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою комп'ютерного пакету програм OriginPro 8.5 (Microcal, США) з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA).

Досліди повторювали тричі з 3-ма паралельними постановками для кожного варіанту контрольних і експериментальних умов. Кожна точка графіків, представлених на рисунках, відповідає середньому значенню «М», розрахованому за результатами 3-ох вимірювань в одному з кількох однотипних експериментів. Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили з використанням *t*-критерію Стюдента. Порівняння двох мінливих

величин здійснювали на підставі показника статистичної значущості відмінностей «р». Відмінність між двома величинами вважали достовірною, коли величина «р» була  $< 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Удосконалення методів ембріональної біотехнології

Важливим завданням введення генно-інженерної конструкції в пронуклеуси зигот є здатність зародків до подальшого розвитку. На виживальність зигот після мікроін'єкції, рівень імплантації та частоту інтеграції трансгена впливає багато факторів, зокрема концентрація робочого розчину ДНК-конструкції, склад буферу для розведення, стадії клітинного циклу зигот й технічне виконання методу [261, 354, 410]. Метою наших досліджень є визначення впливу трансгенної конструкції, що містила ген *1700094C09Rik* (LOC78634) у концентраціях 2 і 4 нг/мкл на розвиток зигот мишей *in vitro*, їх приживлення та частота інтеграції трансгену.

**3.1.1. Вплив мікроін'єкції генетичної конструкції *pGEMA2-1700094C09Rik* на розвиток зигот *in vitro*.** Для визначення впливу концентрацій трансгену порівнювали ефективність подальшого розвитку зигот, мікроін'єкованих різними концентраціями ДНК, буфером TE та інтактними ембріонами мишей при культивуванні *in vitro*. Зародкам 1-ї контрольної групи вводили генетичну конструкцію у концентрації 2 нг/мкл, а в пронуклеус зигот 2-ї дослідної групи ін'єкували трансген у концентрації 4 нг/мкл. До 3-ї дослідної групи віднесли зиготи, у пронуклеус яких вводили ін'єкційний буфер (TE буфер) без ДНК. Як контроль використовували інтактні зиготи, які відразу після виділення з яйцепроводу поміщали у культуральне середовище для *in vitro* культивування.

У таблиці 3.1 представлено результати розвитку *in vitro* дослідних (ін'єкованих) та контрольних (буфер TE) зигот. За 1-шу і 2-гу добу культивування не спостерігалось значних відмінностей між зиготами позитивного контролю (TE буфер) та 1-ї дослідної групи (2 нг/мкл).

Таблиця 3.1.

**Розвиток зигот миші до стадії бластоцисти за умов мікроін'єкції у  
пронуклеус трансгена у різних концентраціях**

Група	Основні показники					
	Кількість ін'єктова них зигот	Зиготи, які перенесли ін'єкцію	Ембріони на стадії 2-4-х клітин		Ембріони на стадії бластоцисти	
	n	n	n	%	n	%
K <sup>+</sup>	21	20	9	45,0±11,41	1	5,0±4,05
Дослідна 1 (2 нг/мкл)	105	70	30	42,85±5,95	6	8,57±3,36
Дослідна 2 (4 нг/мкл)	120	70	25	35,71±5,77*	4	5,71±2,79
K <sup>-</sup>	-	14	10	71,43±12,53	3	21,42±11,37

**Примітка:** \* $p < 0,05$ ; K<sup>+</sup> позитивний контроль, зиготи, ін'єковані ТЕ-буфером; Д 1-зиготи, ін'єковані ДНК концентрацією 2 нг/мкл; Д 2-зиготи, ін'єковані ДНК концентрацією 4 нг/мкл; K<sup>-</sup> від'ємний контроль, інтактні зиготи.

Зокрема відсоток ембріонів, які подолали 2-4-ох клітинну стадію розвитку становив 42,85 % у 1-й дослідній групі проти 45,0 % у позитивному контролі. Збільшення концентрації ДНК до 4 нг/мкл знизило здатність ін'єкованих зигот до подальшого розвитку. Тільки 35,71 % зигот досягнуло стадії дроблення 2-4-ох клітин, що склало вірогідну різницю із 1-ою дослідною групою ( $p < 0,05$ ). Відсоток розвинутих зародків визначали від кількості життєздатних зигот на початковій стадії культивування.

Відсоток зигот, які досягнули стадії бластоцисти у 1-й дослідній групі був вищим у порівнянні з позитивним контролем: 8,57 % проти 5,0 %. Мікроін'єкція екзогенної ДНК у концентрації 4 нг/мкл стримала розвиток

зигот до бластоцитарної стадії: лише 5,71 % ембріонів демонстрували ознаки кавітації і первинної диференціації бластомерів. Отримані результати вказують, що використана генетична конструкція не перешкоджає розвитку зародків і не проявляє токсичного впливу, про що свідчить здатність зигот після мікроін'єкції розвиватись до стадії бластоцисти за умов *in vitro* [261].

**3.1.2. Ефективність інтеграції ДНК і виживаності зигот миші за пронуклеарної мікроін'єкції.** У наступному експерименті вивчали рівень імплантації зигот за ін'єкції різних концентрацій трансгену в пронуклеус після хірургічної трансплантації їх псевдовагітним самкам. У результаті гормональної стимуляції у 6-ти самок було вимито 255 зигот. З них 120 оцінено як такі, що містять видимі пронуклеуси і можуть бути використані для мікроін'єкції вибраної генної конструкції у концентрації 2 нг/мкл ( $n=60$ ) і 4 нг/мкл ( $n=60$ ). Після проведення мікроін'єкції було відібрано та трансплантовано 60 із 84 зигот, які добре перенесли мікроін'єкцію у пронуклеус. Для цього було використано 4 самиці-реципієнти, кожній з яких хірургічно пересадили по 15 зигот. Через 21 добу в 3-ох з 4-ох самок-реципієнтів вагітність закінчилася народженням здорового молодняка. Серед 20-ти народжених мишенят отримано 3 трансгенні нащадки, 1 самець і 2 самочки [261]. Дані щодо ефективності інтеграції гену *Spaca7* (1700094C09Rik) у народжених мишей у результаті трансплантації зигот після мікроін'єкції у пронуклеус представлено нижче (табл 3.2).

Аналізуючи вплив концентрації ДНК – конструкції, яка використана для пронуклеарної мікроін'єкції, на виживання ембріонів та ступінь інтеграції трансгена можна стверджувати, що трансплантація ін'єкованих геном 1700094C09Rik (LOC78634) зигот концентрацією 2 та 4 нг/мкл була успішною в обох групах, однак рівень виживаності зигот внаслідок мікроін'єкції вірогідно відрізнявся, склавши 88,3 % і 46,6 %, у першій і другій дослідній групі відповідно ( $p<0,01$ ).

В обох групах реципієнтам було трансплантовано 30 мікроін'єкованих зигот, по 7-8 зигот у кожен яйцепровід. Рівень імплантацій склав 36,7 % та 30 % без вірогідної різниці між групами.

Таблиця 3.2.

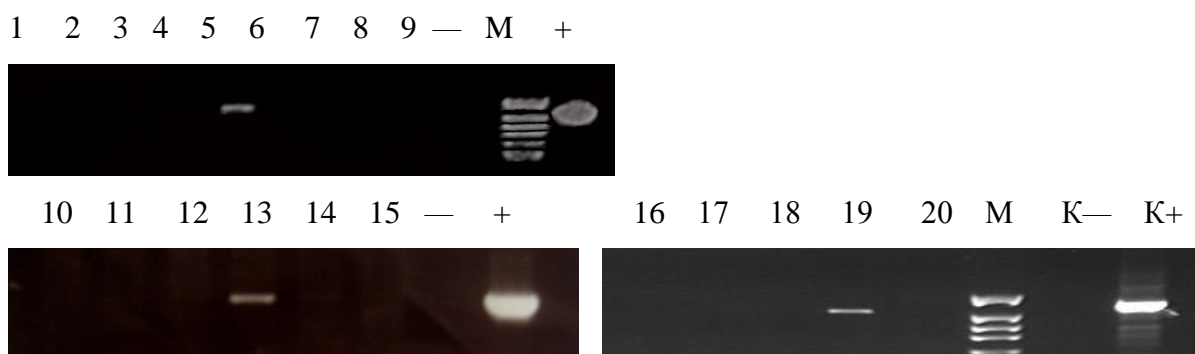
**Інтеграція гена *1700094C09Rik* внаслідок мікроін'єкції у пронуклеус зигот миші**

Основний показник	Група	
	Дослід 1 – 2 нг/мкл	Дослід 2 – 4 нг/мкл
Ін'єкованих зигот, n	60	60
Зиготи, які перенесли ін'єкцію, n-%	53 – 88,3±4,18% **	28–46,6±6,49%
Трансплантовано зигот, n	30	30
Використаних самок-реципієнтів, n	2	2
Вагітних самок-реципієнтів, n-%	2 – 100%	1 – 50%
Народжено мишенят, всього, n	11	9
Рівень імплантації ін'єкованих зигот, %	11/30 – 36,7±8,95%	9/30– 30±8,48%
з них трансгенних, n	2	1
Ступінь інтеграції, %	2/11 – 18,2%	1/9 – 11,1%
Загальна ефективність трансгенезу, %	2/30 – 6,7%	1/30 – 3,3%

З 20 народжених нащадків одержано 3 трансгенних мишенят, що складає 15 % інтеграції гена *1700094C09Rik* (*LOC78634*) в експерименті або 18,2 % за умов ін'єкції екзогенної ДНК у концентрації 2 нг/мкл і 11,1% – у концентрації 4 нг/мкл [261].

Загальна ефективність трансгенезу склала 6,7 % та 3,3 %, відповідно, серед народжених тварин було ідентифіковано 3 трансгенні мишки: дві

самки та один самець. Електрофореграму продуктів ампліфікації ПЛР-аналізу з ДНК тканин хвостів народжених мишенят представлено на рис. 3.1.



**Рис. 3.1. Електрофореграма ампліконів, обмежених праймерами EGF1 (s) и EGF1 (as), у ПЛР-аналізі геномної ДНК нащадків мишей, отриманих після трансплантації зигот ін'єкованих ДНК конструкцією *pGEMA2-1700094C09Rik (LOC78634)*: 1-20 — зразки ДНК, виділені з тканин хвостів народжених нащадків («+» —трансгенні миші); K+ позитивний контроль (плазмідна рHst-GFP); K- - від'ємний контроль (міх PCR); M — маркер (pBS/MspI).**

Аналізуючи результати розвитку мікроін'єкованих у пронуклеус зигот можна припустити, що пріоритетним вибором є безпосередня трансплантація таких зигот псевдовагітним самкам, оскільки культуральне середовище не забезпечує достатніх умов для надолуження бластомерної критичної маси або ж не зумовлює утворення клітинних комплексів, необхідних для перетікання процесів, які супроводжують первинну диференціацію ембріональних бластомерів і перехід до наступної стадії. Зокрема, рівень імплантації зигот після ін'єкції у пронуклеус трансгену у тій чи іншій концентрації був вищий за відсоток зигот, які досягнули стадії бластоцисти поза організмом: 36,7 % та 30% за умов *in vivo* експеримента у порівнянні до 8,6 % і 5,7 % за умов *in vitro* [261].



Використана трансгенна конструкція, яка містить ген *LOC78634*, за умов мікроін'єкцій у пронуклеуси зигот мишей володіє здатністю до інтеграції у геном зиготи-реципієнта. Встановлено, що концентрація трансгену у кількості 2 нг/мкл сприяє зростанню частоти інтеграції до 18,2 % та ефективності трансгенезу 6,7 % у порівнянні до концентрації 4 нг/мкл з 11,1 % та 3,3 % відповідно. Рівень інтеграції та ефективність трансгенезу ін'єктованих зигот, розвинутих у бластоцисти або повноцінних організмах за концентрації вибраної екзогенної ДНК 2 і 4 нг/мкл складає 8,6 % і 5,7 % за умов *in vitro* та 36,7 % та 30 % за умов експеримента *in vivo* [261].

### **3.1.3. Вітрифікація ембріонів миші на стадії двох пронуклеусів.**

Інтенсивний розвиток репродуктивних технологій потребує забезпечення достатньою кількістю біологічного матеріалу, тому кріоконсервування репродуктивних клітин і ембріонів та їх тривале зберігання є однією з найбільш актуальних проблем сучасної біотехнології відтворення. Перспективним методом кріоконсервування ембріонів є їх надшвидке заморожування шляхом твердоповерхневої вітрифікації мікрокрапель. Широке впровадження методу вітрифікації обмежується необхідністю використання високих концентрацій кріопротекторів, що погіршує розвиток і приживлення ембріонів доімплантаційних трансферабельних стадій після розморожування. Тому удосконалення кріозахистних середовищ, підбір кріопротекторів, режимів еквілібрації доімплантаційних зародків вимагає подальших досліджень. Метою даної серії експериментів було вивчити вплив різних кріопротекторів на життєздатність деконсервованих ембріонів миші на стадії 2-ох пронуклеусів після заморожування їх методом твердоповерхневої вітрифікації мікрокрапель.

За результатами досліджень з вивчення впливу кріопротекторів на заморожування ембріонів миші на стадії 2-ох пронуклеусів, встановлено залежність збереження та здатність до подальшого розвитку деконсервованих зародків від складу вітрифікаційного середовища при застосуванні методу надшвидкої твердоповерхневої вітрифікації

мікрокрапель (табл. 3.3).

Таблиця 3.3.

**Вплив різної комбінації кріопротекторів у вітрифікаційному розчині на життєздатність та подальший розвиток деконсервованих ембріонів миші на стадії 2-ох пронуклеусів**

Показник	Склад вітрифікаційного середовища		
	В- 1 40% ЕГ	В- 2 35% ЕГ+5% ПВП	В- 3 28 %ЕГ+12% ДМСО
Кількість вітрифікованих 2-лх клітинних ембріонів	125	240	240
Кількість життєздатних ембріонів після розморожування	115	218	232
Збереженість деконсервованих ембріонів (%)	92,0±2,4 4	90,83±1,87	96,67±1,16
Розвиток деконсервованих ембріонів до стадії 2-ох клітин, n	46	94	122
Коефіцієнт дроблення (%)	40,0±4,5 8	43,12±3,36	52,58±3,27

Через годину після розморожування визначали життєздатність 2-клітинних ембріонів за морфологічною оцінкою. Морфологію 2-клітинних ембріонів оцінювали за цілісністю бластомерів та станом *zona pellucida*. До ембріонів з нормальною морфологією відносили клітини без ознак фрагментації або з незначною фрагментацією цитоплазми, з рівними, чіткими сферичними бластомерами. Встановлено, що при використанні в якості кріопротекторів ЕГ та ДМСО життєздатність зигот була найвищою і становила 96,67 %, тоді як із застосуванням лише етиленгліколю (ЕГ) та ЕГ з ПВП рівень життєздатності ембріонів на стадії пронуклеусів становив 92,0 %

та 90,83 % відповідно.

При дослідженні динаміки дроблення деконсервованих ембріонів миші встановлено, що коефіцієнт дроблення ембріонів був вищим у дослідних групах порівняно з контрольними. За використання 40 % ЕГ у вітрифікованому середовищі при заморожуванні ембріонів на стадії 2-х пронуклеусів і подальшому їх культивуванні 40 % деконсервованих ембріонів розвинулися до стадії 2-х клітин, тоді як за застосування 35 % ЕГ + 5 % ПВП відсоток 2-клітинних ембріонів становив 43,1 %. Найвищий розвиток деконсервованих ембріонів до 2-клітинної стадії був отриманий при додаванні 28 % ЕГ та 12 % ДМСО (52,6 %), порівняно з використанням тільки ЕГ (40,0 %).

**3.1.4. Застосування культури клітин яйцепроводів для розвитку деконсервованих ембріонів миші.** Результати досліджень з вивчення впливу живильного моношару клітин яйцепроводів на розвиток деконсервованих ембріонів миші в умовах *in vitro*, виявили залежність розвитку передімплантаційних зародків, отриманих після заморожування-розморожування від умов культивування.

Для оцінки впливу культуральної системи на розвиток деконсервованих зигот, ембріони груп В 1, В 2 та В 3 після кріоконсервування розділяли на дві підгрупи: дослідну (Д) та контрольну (К). Деконсервовані ембріони дослідної підгрупи співкультивували на моношарі клітин яйцепроводів, тоді як за культивування ембріонів контрольної підгрупи до трансферабельних стадій використовували культуральне середовище ДМЕМ без фідерних клітин.

Результати культивування ембріонів показали, що розвиток ембріонів до всіх стадій був вищим у дослідних групах, за вітрифікації яких, використовували 28 % ЕГ та 12 % ДМСО, у порівнянні з групами, де застосовували ЕГ чи ЕГ з ПВП (табл. 3.4).

Таблиця 3.4.

**Вплив умов культивування на розвиток деконсервованих ембріонів на стадії 2-х пронуклеусів за вітрифікації в різних кріопротекторах**

Розвиток деконсервованих ембріонів до стадії	<b>Системи культивування деконсервованих ембріонів</b>		
	<b>Дослідна підгрупа</b> (культивування з клітинами яйцепроводів)		
	B1- 40% ЕГ	B2- 35% ЕГ +5% ПВП	B3- 28% ЕГ+12% ДМСО
2-х клітин, n	23	47	61
4-клітинних ембріонів, n (%)	19 (82,61±8,08)	40 (85,11±5,24)	52 (85,25±4,58)
8-клітинних ембріонів, n (%)	14 (60,87±10,41)	31 (65,96±6,98)	43 (70,49±5,88)
Морули, n (%)	13 (56,52±10,56)	24 (51,06±7,37)	40 (65,57±6,13)
Бластоцисти, n (%)	12 (52,17±10,64)	24 (51,06±7,37)	40 (65,57±6,13)
<b>Контрольна підгрупа</b> (культуральне середовище)			
Кількість	B1- 40% ЕГ	B2- 35% ЕГ +5% ПВП	B3- 28% ЕГ+12% ДМСО
2-х клітин, n	23	47	61
4-клітинних ембріонів, n (%)	20 (86,96±7,18)	39 (82,98±5,54)	54 (88,52±4,11)
8-клітинних ембріонів, n (%)	16 (69,57±9,81)	30 (63,83±7,08)	42 (68,85±5,98)
Морули, n (%)	13 (56,52±10,56)	24 (51,06±7,37)	39 (63,93±6,19)
Бластоцисти, n (%)	12 (52,17±10,65)	21 (44,68±7,33)	36 (59,02±6,35)

При порівнянні впливу культуральної системи клітин яйцепроводів на розвиток деконсервованих преімплантаційних ембріонів *in vitro* встановлено значний її вплив на розвиток ембріонів пізніх стадій. Так, значних відмінностей за рівнем розвитку ембріонів до стадій 4-ох клітин між дослідними групами за різних умов культивування не спостерігали. Після ко-культивування деконсервованих ембріонів, вітрифікованих за комбінації 35% ЕГ+5% ПВП на фідерному моношарі клітин яйцепроводів 65,96 %

розвинулись до 8-ми клітинної стадії, тоді як за культивування у середовищі без клітин цей показник становив 63,83 %.

Розвиток деконсервованих ембріонів, вітрифікованих у розчині ЕГ і ДМСО до стадії морули був вищим (65,57 %), ніж ембріонів, заморожених у розчині 40% ЕГ (56,52%) та комбінації кріопротекторів 35 % ЕГ з 5 % ПВП (51,06 %). Водночас, при порівнянні умов культивування деконсервованих ембріонів В3 групи, 65,57 % ембріонів знаходилось на стадії морули за культивування на фідерному моношарі клітин яйцепроводів, тоді як за культивування у середовищі ДМЕМ спостерігали зменшення кількості морул до 63,93 %.

Застосування клітин яйцепроводів дозволило отримати вищий відсоток бластоцист порівняно з використанням стандартного середовища ДМЕМ. Ко-культивування ембріонів на моношарі клітин яйцепроводів дозволило підвищити показник дроблення ембріонів до стадії бластоцисти за вітрифікації у розчині з ЕГ і ДМСО, порівняно з групою кріоконсервованих ембріонів, які дозрівали *in vitro* без клітин у середовищі ДМЕМ (65,57 % проти 59,02 % відповідно).

Під час порівняння показників дроблення деконсервованих ембріонів, вітрифікованих за комбінації 35 % ЕГ та 5 % ПВП до стадії бластоцисти, також спостерігали відмінності між двома підгрупами, які відрізнялися подальшими умовами культивування деконсервованих ембріонів. Так, відсоток дроблення до бластоцисти був вищим у підгрупі за ко-культивування з клітинами яйцепроводів (дослідна підгрупа В 3) і перебував на рівні 51,06 %, порівняно з аналогічним за складом кріопротекторів варіантом (контрольна підгрупа В 3), ембріони якої культивувалися без фідерного моношару – 44,68 %.

Результати досліджень даного розділу опубліковані у [261, 589, 590].

### **3.2. Створення об'ємної культуральної системи для забезпечення дозрівання ооцитів і розвитку ранніх ембріонів *in vitro***

Одним із головних завдань клітинної біотехнології є вибір адекватного носія для клітин, оскільки тривале культивування на носії-підкладці впливає на функціональну активність, проліферативну здатність, диференціацію та гістогенетичні властивості. В останні роки значна увага приділяється використанню об'ємних клітинних моделей на заміну клітинній моношаровій культурі [57, 94]. Клітини, які ростуть на об'ємних матриксах значно різняться за морфологією та ступенем диференціації. За таких умов, взаємодії між клітинами і клітиною та матриксом є більше наближені до умов живого організму [605].

Для конструювання наноповерхні використовують як природні компоненти (колаген, фібрин, хітозан, кератиноцити), так і синтетичні матеріали (модифіковані форми гіалуронової кислоти, поліетиленгліколь, поліаміди, силікон, поліетилентерефталат, полімери гліколевої та молочної кислот, новий клас полімерів) [94]. Вибір того чи іншого з них визначається метою експерименту і залежить як від природи і геометрії твердої поверхні [424], так і типу наявних в полімері функціональних груп. Своєю чергою ріст клітин, їх функціональна активність і диференціація залежать від типу носія, мобілізованого на модифікованій поверхні. Перед використанням наноповерхні для вирощування різних типів клітин, необхідно провести оцінку біосумісності матриксів на стандартизованих клітинних лініях та первинних культурах клітин.

**3.2.1. Скринінг біосумісності нанопокриттів на мишачих ембріональних фібробластах лінії NIH3T3 і клітинах лінії HEK-293 ембріона нирки людини.** При порівнянні даних проліферативної активності ембріональних фібробластів на поверхнях з різноманітними модифікаціями скла було відмічено вірогідне підвищення росту клітин лінії NIH3T3 у групах за культивування на поверхні АПТЕС (1-ша група) та

АПТЕС+декстран (2-га група) (табл. 3.5).

Таблиця 3.5.

**Проліферація клітин лінії NIH3T3 за культивуванні на різних  
модифікованих поверхнях, n=3; M±m**

Група	Концентрація клітин млн/мл через 24 год культивування	Концентрація клітин млн/мл через 48 год культивування	Концентрація клітин млн/мл через 72 год культивування
Контроль	1,27±0,01	1,80±0,03	1,81±0,07
Д <sub>1</sub> (АПТЕС)	1,33±0,15	2,65±0,09***	2,15±0,03
Д <sub>2</sub> (АПТЕС+декстран)	1,27±0,03	2,89±0,06***	2,53±0,02***
Д <sub>3</sub> (АПТЕС+альбумін)	1,46±0,01*	2,19±0,06**	1,85±0,05
Д <sub>4</sub> (альбумін)	1,71±0,01**	1,85±0,02	1,85±0,08
Д <sub>5</sub> (АПТЕС+декстран+альбумін)	2,00±0,03***	1,89±0,07	1,81±0,04

**Примітки:** У цій і наступних таблицях та рисунках статистично вірогідні різниці стосовно контрольної групи: \* —  $p<0,05$ ; \*\* —  $p<0,01$ ; \*\*\* —  $p<0,001$ .

На 24-ту год культивування, у 3-ій (АПТЕС+альбумін) ( $p<0,05$ ), 4-ій (альбумін) ( $p<0,01$ ) та 5-ій (АПТЕС+декстран+альбумін) ( $p<0,001$ ) дослідних групах відмічено вірогідне підвищення рівня проліферації клітин порівняно з поверхнею «чистого скла» (контрольна група). Висока проліферативна активність клітин на 48-ту год культивування спостерігалась у 1-ій, 2-ій і 3-ій дослідних групах — на поверхнях АПТЕС, АПТЕС+декстран та АПТЕС+альбумін — кількість клітин у даних групах становила 2,65 ( $p<0,001$ ), 2,89 ( $p<0,001$ ) та  $2,19 \times 10^6$  млн/мл ( $p<0,01$ ) відповідно, при концентрації клітин у контрольній групі — 1,80 млн/мл.

На 72-гу год культивування встановлено інтенсивний ріст тільки у 2-ій дослідній групі (АПТЕС+декстран), у той же час в інших дослідних групах концентрація клітин була на рівні контрольної групи.

Для підтвердження функціональної активності ембріональних фібробластів у процесі їх культивування, проведено біохімічні дослідження кондиційного середовища через кожні 24 год культивування (табл. 3.6).

Таблиця 3.6.

**Активність ЛДГ і концентрація глюкози у кондиційному середовищі за культивування клітин лінії NIH3T3 на модифікованих поверхнях, n=3;**

**M±m**

Група	Термін культиву- вання, год	Біохімічні показники	
		ЛДГ	глюкоза
		МО	г/л
Контроль	24	38,3±0,28	19,01±0,35
	48	21,2±0,65	8,33±0,43
	72	0,9±0,12	1,19±0,07
Д <sub>1</sub> (АПТЕС)	24	37,3±0,25	18,75±0,56
	48	25,9±0,85**	10,59±0,38*
	72	0,6±0,08	1,20±0,04
Д <sub>2</sub> (АПТЕС+декстран)	24	37,5±0,3	18,71±0,52
	48	19,7±0,84	9,41±0,47
	72	0,2±0,06**	0,93±0,07
Д <sub>3</sub> (АПТЕС+альбумін)	24	38,0±0,97	18,62±0,92
	48	16,5±0,43**	13,78±0,78**
	72	0,20±0,08**	0,39±0,06***
Д <sub>4</sub> (альбумін)	24	36,4±0,96	18,55±0,52
	48	18,4±0,71*	8,96±0,75
	72	1,4±0,13*	0,19±0,03***
Д <sub>5</sub> (АПТЕС+декстран+альбумін)	24	34,4±0,89**	18,01±0,73
	48	10,8±0,71***	2,42±0,39***
	72	0,20±0,06**	0,43±0,04***



Активність лактатдегідрогенази на 48-му год культивування в усіх дослідних групах, крім 1-ої, знижується відносно показнику контрольної групи. Це можна пов'язати з високою активністю проліферативних процесів у даний часовий термін культивування ембріональних фібробластів за культивування на модифікованих поверхнях. Незначна ЛДГ активність спостерігається в контрольній та всіх дослідних групах на 72-гу год культивування, що співпадає із зростанням проліферативної активності клітин у цих групах та високою їх життєздатністю.

У контрольній групі вміст глюкози поступово знижується з 19,01 г/л на 24-ту годину культивування до 1,19 г/л на 72-гу год культивування, що вказує на інтенсивне її засвоєння та посидений вуглеводний обмін у контрольній групі. У 2-ій, 4-ій та 5-ій дослідних групах на 48-му год культивування ембріональних фібробластів виявлено зниження вмісту глюкози до 9,41, 8,96 та 2,42 г/л ( $p < 0,001$ ), що вказує на її використання як енергетичного субстрату за підвищеного рівня біосинтетичних процесів у клітинах.

Тоді як у 1-ій ( $p < 0,05$ ) та 3-ій ( $p < 0,01$ ) дослідних групах цей показник є вірогідно вищим порівняно до контролю. Подальше культивування до 72-ох год призводить до зниження концентрації глюкози у кондиційному середовищі як контрольної, так і всіх дослідних груп, що вказує на високий рівень вуглеводного обміну в клітинах.

Біосумісність і функціональна властивість модифікованих поверхонь підтверджується *in vitro* в МТТ-тесті. Результати досліджень показали, що 96,39, 94,96 та 97,43 % клітин за культивування на поверхнях АПТЕС+альбумін (3-тя група), альбумін (4-та дослідна група) та АПТЕС+декстран+альбумін (5-та дослідна група) зберігали високу життєздатність (табл. 3.7).

Життєздатність клітин 1-ої та 2-ої дослідних груп на початку культивування була найвищою і становила 104,63 та 115,22 %, а на 72-гу год культивування знизилась до 88,57 та 86,58 %.

Таблиця 3.7.

**Життєздатність клітин лінії NIH3T3 при культивуванні на  
модифікованих поверхнях за МТТ-тестом, n=3**

Група	МТТ, % від контролю		
	Термін культивування, год		
	24	48	72
Контроль	100	100	100
Д <sub>1</sub> (АПТЕС)	104,63±10,68	104,22±6,37 <sup>c</sup>	88,57±3,67
Д <sub>2</sub> (АПТЕС+декстран)	115,22±0,74 <sup>a</sup>	74,02±4,22 <sup>d</sup>	86,58±3,48
Д <sub>3</sub> (АПТЕС+альбумін)	99,74±1,84	95,53±4,30 <sup>e</sup>	96,39±4,11
Д <sub>4</sub> (альбумін)	97,81±3,17	89,28±0,87	94,96±4,79
Д <sub>5</sub> (АПТЕС+декстран+альбумін)	85,92±2,01 <sup>b</sup>	88,9±0,84	97,34±7,05

**Примітка:** \* b:a; d:c; e:d – p<0,05.

Проведені дослідження виявили, що нанопокриття не мають токсичних властивостей і можуть бути використані для культивування різних видів клітин. Модифіковані поверхні скло+АПТЕС+альбумін і скло+АПТЕС+декстран сприяють підвищенню проліферативної активності і життєздатності фібробластів, посиленню адгезії клітин та їх функціональній здатності, і можуть бути використані для конструювання клітинних матриксів для вирощування клітин маткового походження для культивування ооцитів та ембріонів.

У таблиці 3.8. наведено динаміку проліферації ембріональних клітин нирки лінії НЕК-293 при культивуванні на поверхнях, модифікованих прищепленим наночаром полі(N-метакрилоїл-L-лейцину). Результати досліджень показали, що за культивування клітин лінії НЕК 293 на поверхні, модифікованій L-лейцином, інтенсивність проліферації клітин зростає порівняно з поверхнею «чистого скла» (контрольна група).

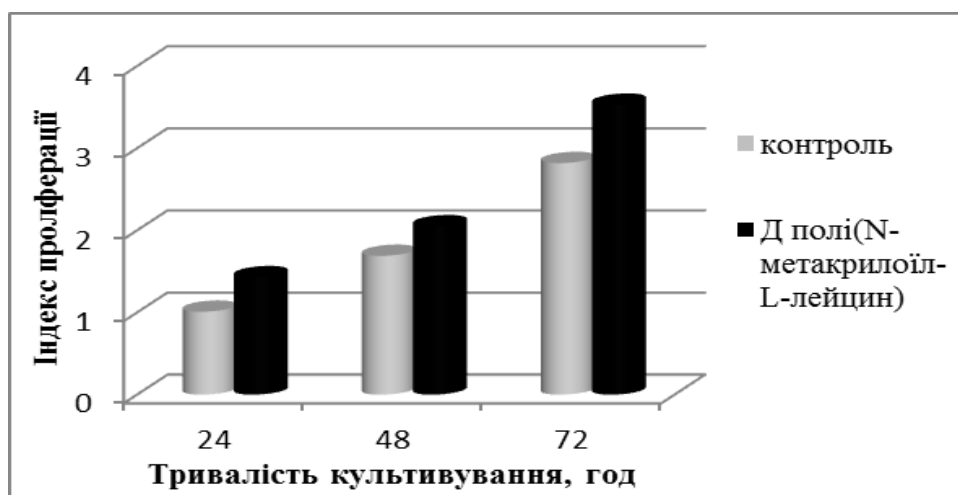
Таблиця 3.8.

**Проліферативна активність клітин лінії НЕК 293 на модифікованій та контрольній поверхні впродовж 72-ох год культивування**

Природа поверхні	Концентрація клітин		
	24 год	48 год	72 год
Шкло	1,01±0,04	1,69±0,1	2,82±0,02
Полі(N-метакрилоїл лейцин)	1,43±0,15	2,05±0,03	3,53±0,08

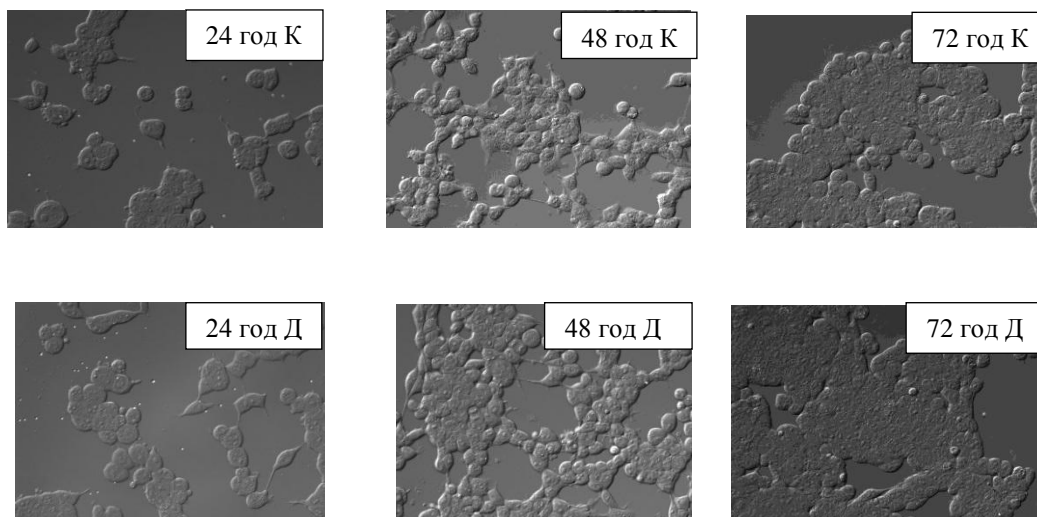
На 48-му та 72-гу год культивування відмічено підвищення концентрації клітин за культивування на поверхні, модифікованій L-лейцином щодо контрольної групи.

Індекс проліферації клітин впродовж культивування був вищим у дослідній групі, клітини якої культивувалися на наноповерхні, модифікованій L-лейцином порівняно з контрольною групою (рис. 3.2).



**Рис. 3.2. Індекс проліферації клітин лінії НЕК-293. Клітини культивували на нанопокритті з L-лейцином упродовж 72 годин.**

На **рис. 3.3** наведено мікрофотографії клітин лінії НЕК-293 за різної тривалості культивування на поверхнях, модифікованих прищепленим наночаром полі(*N*-метакрилоїл-*L*-лейцину).



Аналіз даних показав, що при культивуванні клітин лінії НЕК-293 спостерігається їх швидкий ріст з наступним формуванням моношару клітин. Клітини, культивовані на поверхнях, модифікованих прищепленим наночаром полі(*N*-метакрилоїл-*L*-лейцину), проявили значно вищу проліферативну активність та життєздатність, ніж на поверхні немодифікованого скла [145, 146].

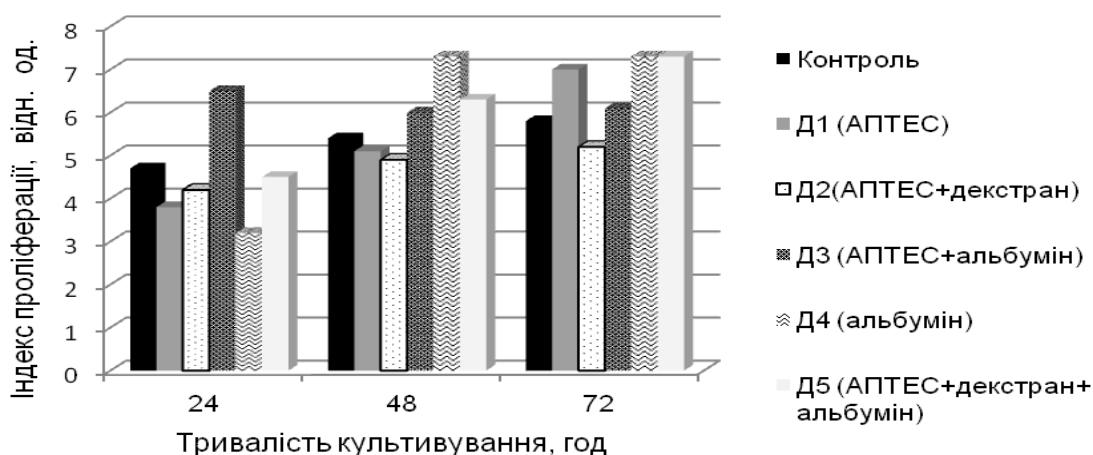
Для дослідження взаємодії клітин лінії В16F10 з різними структурними компонентами модифікованих поверхонь проведено оцінку морфології клітин, індексу проліферації та кількості пошкоджених клітин через 24, 48 та 72 год культивування (табл. 3.9, рис. 3.4, рис. 3.5).

Таблиця 3.9.

**Проліферативна активність клітин лінії B16F10 за умов культивування на різних модифікованих поверхнях, n=3; M±m**

Група	Концентрація клітин на 24 год культивування	Концентрація клітин на 48 год культивування	Концентрація клітин на 72 год культивування
Контроль	2,03±0,02	2,33±0,05	2,50±0,03
Д <sub>1</sub> (АПТЕС)	1,65±0,03**	2,19±0,03	2,99±0,08*
Д <sub>2</sub> (АПТЕС+декстран)	1,80±0,06**	2,13±0,04*	2,23±0,05**
Д <sub>3</sub> (АПТЕС+альбумін)	2,81±0,04***	2,58±0,04**	2,61±0,02
Д <sub>4</sub> (альбумін)	1,39±0,07*	3,13±0,06***	3,14±0,07**
Д <sub>5</sub> (АПТЕС+декстран+альбумін)	1,94±0,03	2,71±0,04**	3,13±0,04***

При порівнянні індексу проліферації клітин лінії B16F10 впродовж 72-ох год культивування було відмічено поступове підвищення росту клітин на поверхнях, модифікованих АПТЕС (1-ша група), АПТЕС+декстран (2-га група), альбуміном (4-та група) та АПТЕС+декстран+альбуміном (5-та група) (рис. 3.4).

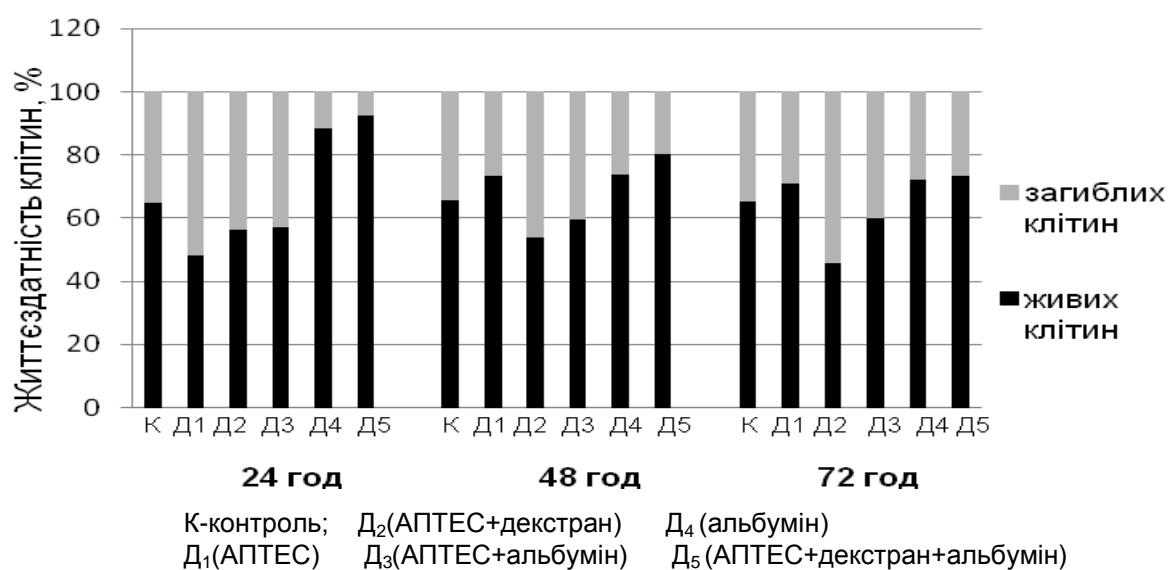


**Рис. 3.4. Індекс проліферації клітин лінії B16F10.**

Тоді як у 3-й дослідній групі при мобілізації поверхні АПТЕС+альбумін проліферативна активність клітин на 24 год культивування була найвищою серед усіх груп, а на 48-72 год культивування - поступово знижувалася.

У 4-ій дослідній групі за культивування клітин на нанопокритті з альбуміном, навпаки, спостерігалась тенденція до зростання індексу проліферації з 3,2 на 24-ту год до 7,3 на 48-72-гу год культивування.

Аналізуючи дані про вплив досліджуваних наноповерхонь на адгезію та життєздатність клітин, відзначена залежність між компонентним складом нанопокриття та життєздатністю культури клітин. Зниження кількості життєздатних клітин упродовж тривалого культивування спостерігалось за культивування клітин лінії B16F10 на поверхнях, модифікованих АПТЕС+декстран (2 група) (рис. 3.5).



**Рис. 3.5. Життєздатність клітин лінії B16F10 за культивування на різних нанопокриттях впродовж 72 год.**

Відсоток життєздатних клітин контрольної та 3-ої дослідної груп (АПТЕС+альбумін) упродовж культивування зберігається на одному рівні,

тоді як у 1-ій дослідній групі (АПТЕС) відмічено зростання життєздатності клітин з 48 % на 24-ту год культивування до 70,8 % на 72-гу год культивування. Життєздатність клітин 4-ої та 5-ої дослідних груп, культивованих на нанопокриттях з альбуміном та комплексом АПТЕС+декстран+альбумін, на 24-ту год культивування була найвищою і становила відповідно 88,3 та 92,6 %, тоді як на 72-гу год культивування життєздатність клітин цих груп знизилась до 72,3 та 73,5 %, що зумовлено інтенсивним ростом клітин у даних групах.

Зміну метаболічного стану клітин оцінювали за активністю цитозольного ензиму ЛДГ у кондиційному середовищі, який використовується як маркер порушення цілісності клітинних мембран та за сумарною активністю мітохондріальних дегідрогеназ у МТТ-тесті, який відображає інтенсивність клітинного дихання (табл. 3.10).

*Таблиця 3.10.*

**ЛДГ активність у кондиційному середовищі за культивування клітин лінії B16F10 на модифікованих поверхнях, n=3; M±m**

Група	ЛДГ, МО		
	Термін культивування, год		
	24	48	72
Контроль	53,2±1,56	42,7±0,40	41,2±0,72
Д <sub>1</sub> (АПТЕС)	49,5±0,99	25,4±1,02***	24,8±0,69***
Д <sub>2</sub> (АПТЕС+декстран)	45,3±0,45**	35,5±0,76***	39,7±0,85
Д <sub>3</sub> (АПТЕС+альбумін)	39,5±0,72***	41,0±0,91	38,2±0,67*
Д <sub>4</sub> (альбумін)	34,0±0,60***	28,5±0,67***	23,1±0,92***
Д <sub>5</sub> (АПТЕС+декстран+альбумін)	28,9±0,92***	28,4±0,93***	18,4±0,53***

Найвищий рівень активності ЛДГ у середовищі культивування клітин лінії B16F10 на 24 год відмічено у контрольній групі. Активність ензиму на 48-му і 72-ту год культивування дещо знижувалася в контролі, проте

впродовж всього періоду культивування залишалась на досить високому рівні. Аналогічна тенденція відзначена також у 2-ій (АПТЕС+декстран) та 3-ій (АПТЕС+альбумін) групах.

У 1-ій, 4-ій та 5-ій дослідних групах на 48-72 год культивування ЛДГ активність у середовищі вірогідно знижувалася порівняно з 24-ою год культивування ( $p < 0,001$ ), що пов'язано зі зростанням проліферативної активності клітин у цих групах та їх високою життєздатністю.

Життєздатність клітин меланоми, культивованих на нанопокриттях, вивчали за інгібуванням інтенсивності клітинного дихання за допомогою МТТ-тесту (табл. 3.11).

Таблиця 3.11.

**Життєздатність клітин лінії B16F10 при культивуванні на модифікованих поверхнях за МТТ-тестом,  $n=3$**

Група	МТТ, % від контролю		
	Термін культивування, год		
	24	48	72
Контроль	100	100	100
Д <sub>1</sub> (АПТЕС)	53,67±5,29 <sup>a</sup>	82,4±4,08	72,97±3,83
Д <sub>2</sub> (АПТЕС+декстран)	62,97±2,51 <sup>b</sup>	68,1±3,56	67,33±2,53 <sup>b</sup>
Д <sub>3</sub> (АПТЕС+альбумін)	70,63±3,27 <sup>c</sup>	67,87±3,20	71,5±1,97
Д <sub>4</sub> (альбумін)	86,63±1,79 <sup>d</sup>	79,3±3,21	80,8±3,49
Д <sub>5</sub> (АПТЕС+декстран+альбумін)	94,87±4,78 <sup>f</sup>	84,3±2,34	84,5±0,85 <sup>f</sup>

Примітка: a:d; b:d; a:f; b:f; c:f –  $p < 0,05$ .

На 24-ту год культивування найвища метаболічна активність клітин відмічена в 4-ій та 5-ій дослідних групах за культивування на нанопокриттях з альбуміном та комплексом АПТЕС+декстран+альбумін. Найнижчою метаболічна активність клітин меланоми на першу добу культивування була в 1-ій дослідній групі з АПТЕС, однак при подальшому культивуванні



життєздатність клітин цієї групи зростає. У 2-ій дослідній групі (АПТЕС+декстран) упродовж всього періоду культивування метаболічна активність клітин залишається на одному рівні. Так, життєздатність клітин усіх дослідних груп складала 65-92,6 %, а отже, задіяні у досліді компоненти нанопокриттів не викликають зниження адгезії та проліферативної активності клітин меланом.

Аналіз даних показав, що за культивування клітин лінії B16F10 на поверхнях, модифікованих альбуміном та комплексом АПТЕС+декстран+альбумін спостерігається вища проліферативна активність та життєздатність клітин, ніж на поверхнях, модифікованих іншими прищепленими наночастинами.

**3.2.2. Вплив різних нанопокриттів на проліферативну та метаболічну активність клітин яйцепроводів корів *in vitro*.** Вплив модифікованих поверхонь на основі АПТЕС та комплексу АПТЕС разом із декстраном досліджували на культурі клітин яйцепроводів корів (табл. 3.12).

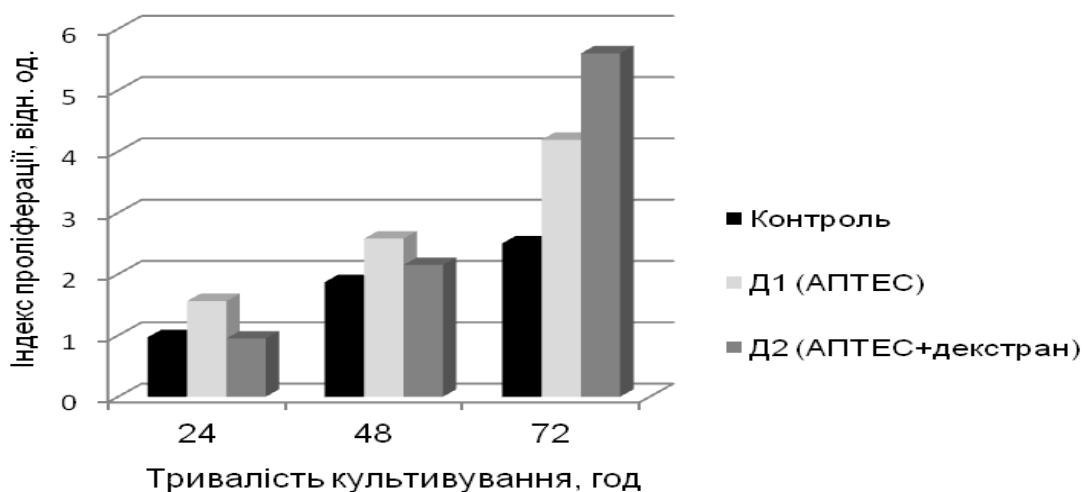
Таблиця 3.12.

**Проліферативна активність клітин яйцепроводів за умов культивування на нанопокриттях АПТЕС та АПТЕС+декстран ( $M \pm m$ ),  $n=3$**

Група	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл через 24 год культивування	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл через 48 год культивування	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл через 72 год культивування
Контроль	$0,78 \pm 0,07$	$1,49 \pm 0,03$	$2,0 \pm 0,11$
Д <sub>1</sub> (АПТЕС)	$1,25 \pm 0,05^{**}$	$2,06 \pm 0,13^{**}$	$3,36 \pm 0,14^{***}$
Д <sub>2</sub> (АПТЕС+декстран)	$0,76 \pm 0,01$	$1,72 \pm 0,18$	$4,48 \pm 0,29^{***}$

У результаті проведених досліджень встановлено вірогідне збільшення концентрації клітин у 1-ій дослідній групі (АПТЕС) на 24-ту год культивування ( $p < 0,01$ ), тоді як у контролі та 2-ій дослідній групі (АПТЕС+декстран) проліферативна активність культури знаходилась на одному рівні. На 48-му год культивування клітин яйцепроводів спостерігали вірогідне підвищення рівня проліферації клітин у 1-ій дослідній групі за культивування на наноповерхні з АПТЕС, та у 2-ій дослідній групі при використанні поверхні АПТЕС+декстран у порівнянні з контролем. На 72-гу год культивування в обох дослідних групах спостерігали вірогідне зростання концентрації клітин ( $p < 0,001$ ), що у 1,68 та 2,24 разів перевищувало відповідний показник контрольної групи.

Індекс проліферації клітин на 24-ту год культивування був найвищим у 1-ій дослідній групі, тоді як в контролі та 2-ій дослідній групі величина показнику була на одному рівні (рис. 3.6).



**Рис. 3.6. Індекс проліферації клітин яйцепроводів за умов культивування на нанопокриттях АПТЕС та АПТЕС+декстран упродовж 72 год.**

Аналогічна тенденція індексу проліферації зберігається і на 48-ту год культивування. Так, у 2-ій дослідній групі та контролі на 48-му год

культивування відмічено підвищення у 2 рази індексу проліферації, порівняно до 24-ох год культивування, однак ці величини були в 1,2-1,4 раза нижчі у порівнянні з показником 1-ої дослідної групи. Через 72-ві год культивування індекс проліферації зростає в усіх групах, однак, у 2-ій дослідній групі відмічено значне його підвищення.

Встановлено, що нанопокриття скляної поверхні АПТЕС підвищує проліферацію, життєздатність і проліферативний індекс культури клітин яйцепроводів корів упродовж усього періоду культивування, а комплекс АПТЕС разом з декстраном проявляє стимувальний вплив на культуру клітин на 48-му і 72-гу год культивування.

Відсоток життєздатних клітин, які культивували на наноповерхні з АПТЕС був найвищим щодо контролю та дослідної групи, при культивуванні клітин якої використовували поверхню з АПТЕС+декстран (рис. 3.7). Тоді як у 2-ій дослідній групі відмічено зниження життєздатності клітин з 100% на 24-ту год культивування до 88,38 % на 72-гу год культивування, що зумовлено інтенсивним проліферативним ростом клітин у даній групі на 3-тю добу культивування.



**Рис. 3.7. Життєздатність клітин яйцепроводів за умов культивування на нанопокриттях АПТЕС та АПТЕС+декстран.**

При визначенні динаміки обміну глюкози у культурі клітин яйцепроводів корів встановлено зниження її вмісту в кондиційному середовищі дослідних та контрольної груп у 3 рази на 48-му год культивування та в 15-30 разів на 72-ту год, порівняно з кондиційним середовищем на 24-ту год культивування (табл. 3.13). Зниження вмісту глюкози впродовж 72-годинного культивування вказує на високий рівень біосинтетичних процесів культури клітин усіх груп та посилений вуглеводний обмін в клітинах у результаті інтенсивного проліферативного росту клітин.

Таблиця 3.13.

**Біохімічні показники кондиційного середовища культивування культури яйцепроводів на різних наноповерхнях, n=3; M±m**

Група	Тривалість культивування, год		
	24	48	72
	ЛДГ, МО		
Контроль	40,83±1,64	23,46±1,11	1,22±0,16
Д <sub>1</sub> (АПТЕС)	48,23±1,18**	18,1±1,0**	0,83±0,08
Д <sub>2</sub> (АПТЕС+декстран)	45,4±1,37	21,56±1,18	1,17±0,18
Глюкоза, г/л			
Контроль	7,03±0,18	2,4±0,13	0,47±0,05
Д <sub>1</sub> (АПТЕС)	8,17±0,31*	3,0±0,13*	0,22±0,08
Д <sub>2</sub> (АПТЕС+декстран)	7,8±0,2*	2,57±0,11	0,25±0,02***

Активність ЛДГ контрольної групи у середовищі культивування клітин яйцепроводів на 24-ту год була найнижча, порівняно з дослідними групами. На 48-72 год культивування ЛДГ активність усіх груп знижувалася відносно її активності на 24-ту год культивування, що пов'язано зі зростанням проліферативної активності клітин та їх високою життєздатністю.

Для дослідження цитотоксичності полімерів, використаних для модифікації скляних поверхонь проведено дослідження життєздатності клітин за допомогою МТТ-тесту (табл. 3.14). Встановлено, що в 1-ій дослідній групі впродовж усього періоду культивування метаболічна активність клітин була вищою у порівнянні з показниками 2-ої дослідної групи.

Таблиця 3.14.

**Життєздатність культури клітин яйцепроводів після  
культивування на модифікованих поверхнях за МТТ-тестом, n=3**

Група	МТТ, % від контролю		
	Термін культивування, год		
	24	48	72
Контроль	100	100	100
Д <sub>1</sub> (АПТЕС)	106,9±7,02	106,7±5,28	96,17±2,28
Д <sub>2</sub> (АПТЕС+декстран)	98,37±3,15	87,63±2,54*	86,17±2,14*

Життєздатність клітин 2-ої дослідної групи також була високою і складала 82-95,9 %, що вказує на те, що досліджувані нанопокриття з декстраном не викликають зниження адгезії та проліферативної активності клітин яйцепроводів.

Встановлено, що культивування клітин яйцепроводів на нанопокритті з АПТЕС сприяє високій життєздатності культури при визначенні цитотоксичності за допомогою МТТ-тесту, а комплекс АПТЕС разом із декстраном викликає дещо нижчий ефект. Аналіз показників ЛДГ та глюкози у кондиційному середовищі за культивування клітин яйцепроводів на нанопокриттях свідчить про підвищення життєздатності та інтенсивності біосинтетичних процесів у культурі клітин.

**3.2.3. Ефективність покриттів біогелю природнього походження та нанопокриття альбуміну за культивування фібробластів лінії NIH3T3**

**миші та клітин яйцепроводів і ендометрію кролиць.** З метою створення об'ємних культуральних систем з використанням природніх компонентів носієм обрали курячий овальбумін з високою адгезивною здатністю [464], багатий на біоактивні речовини [396], що дозволяє підтримати ріст і розвиток клітин. На основі отриманих результатів щодо позитивного впливу нанопокриття з альбуміном проведено порівняльні дослідження біогелю природнього походження та альбуміну, нанесеного на скельця методом органічного синтезу, на ембріональних фібробластах лінії NIH3T3 та клітин яйцепроводів. Вірогідне збільшення концентрації клітин на 24 год культивування виявлено у 1-ій дослідній групі з біогелем ( $p < 0,01$ ) на основі овальбуміну в порівнянні з контролем та дослідною групою з нанопокриттям на основі альбуміну (табл. 3.15).

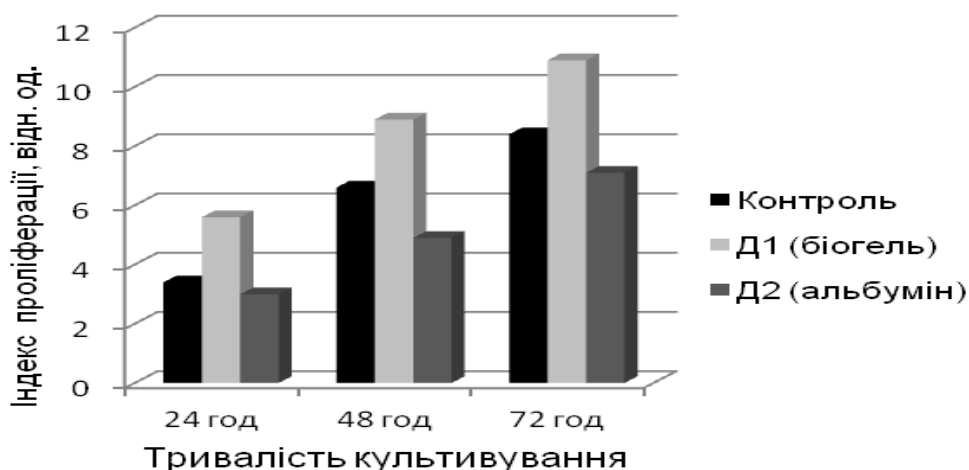
Таблиця 3.15.

**Проліферативна активність фібробластів лінії NIH3T3 миші за  
культивування на біогелі та альбуміні,  $n=3$ ;  $M \pm m$**

Група	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл через 24 год культивування	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл через 48 год культивування	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл через 72 год культивування
Контроль	$1,69 \pm 0,13$	$3,29 \pm 0,16$	$4,19 \pm 0,22$
Д <sub>1</sub> (біогель )	$2,82 \pm 0,16^{**}$	$4,46 \pm 0,04^{**}$	$5,44 \pm 0,22^{**}$
Д <sub>2</sub> (альбумін)	$1,48 \pm 0,1$	$2,43 \pm 0,01^{**}$	$3,55 \pm 0,2$

На 48-му та 72-гу год культивування клітин спостерігали вірогідне підвищення рівня проліферації клітин у 1-ій дослідній групі ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ), за культивування на біогелі та зниження проліферативного росту клітин у 2-ій дослідній групі за використання поверхні з альбуміном ( $p < 0,01$ ) у порівнянні до контрольної групи.

Індекс проліферації клітин на 24-ту год культивування був найвищим у 1-ій дослідній групі, тоді як у контролі та 2-ій дослідній групі цей показник був на приблизно на одному рівні (рис. 3.8).



**Рис. 3.8. Індекс проліферації ембріональних фібробластів лінії NIH3T3 за умов культивування на біогелі та альбуміні.**

На 48-му та 72-гу год культивування індекс проліферації зростає в усіх групах, однак у 1-ій дослідній групі відмічено значний ріст клітин, що в 1,8 та 1,5 раза перевищує показники 2-ої дослідної групи, проліферативна активність клітин якої поступово зростала впродовж досліджуваного періоду культивування, хоча залишалась нижчою в порівнянні з контролем.

Отже, культивування клітин лінії NIH3T3 на основі альбуміну сприяє підвищенню проліферації, життєздатності та проліферативного індексу культури клітин упродовж всього періоду культивування.

Аналіз біохімічних показників кондиційного середовища ембріональних фібробластів лінії NIH3T3 після культивування на біогелі та модифікованих наноповерхнях з альбуміном виявив зниження активності ЛДГ в усіх групах упродовж культивування (табл. 3.16). Активність ЛДГ у кондиційному середовищі 2-ої дослідної групи після 24-х год культивування

ембріональних фібробластів лінії NIH3T3 була найнижчою у порівнянні з контрольною та 1-ою дослідною групою.

Таблиця 3.16.

**Біохімічні показники кондиційного середовища за культивування клітин лінії NIH3T3 на біогелі та модифікованій наноповерхні з альбуміном, n=3; M±m**

Група	Тривалість культивування, год		
	24	48	72
	ЛДГ, МО		
Контроль	47,1±0,89	30,1±0,70	30,1±0,70
Д <sub>1</sub> (біогель)	48,2±1,18	20,7±0,70***	3,9±0,05***
Д <sub>2</sub> (альбумін)	36,4±0,34**	23,9±0,80*	6,5±0,56**
Глюкоза, г/л			
Контроль	11,6±0,94	3,8±0,24	1,1±0,12
Д <sub>1</sub> (біогель)	14,9±0,82	2,7±0,25*	0,68±0,08
Д <sub>2</sub> (альбумін)	12,6±0,86	3,6±0,42	0,95±0,06

У контрольній та обох дослідних групах на 48-72 год культивування активність ЛДГ знижувалась відносно її рівня на 24 год, що пов'язано зі зростанням проліферативної активності клітин та їх високою життєздатністю [601].

Визначення динаміки обміну глюкози впродовж культивування ембріональних фібробластів лінії NIH3T3, дозволило встановити зниження у 1,5-2,4 раза її вмісту в кондиційному середовищі дослідних та контрольної групи на 48-му год культивування та у 6-12 разів на 72 год культивування порівняно з кондиційним середовищем на 24 год. Зниження вмісту глюкози упродовж 72-годинного культивування вказує на високий рівень біосинтетичних процесів культури клітин усіх груп та посилений вуглеводний обмін в клітинах у результаті інтенсивного росту клітин [601].



Дослідженнями життєздатності клітин лінії НІНЗТЗ, після культивування на біогелі та альбуміні за допомогою МТТ-тесту встановлено, що метаболічна активність клітин в 1-ій дослідній групі впродовж всього періоду культивування становила 87,6 %, 135,6 % та 115,3 %, і була вищою за показники 2-ої дослідної групи (табл. 3.17).

Таблиця 3.17.

**Життєздатність ембріональних фібробластів лінії НІНЗТЗ за  
культивування на біогелі та альбуміні, n=3**

Дослідні групи	МТТ, % від контролю		
	Термін культивування, год		
	24	48	72
Контроль	100	100	100
Д <sub>1</sub> (біогель)	90,45±1,54	136,37±2,54*	119,98±6,56*
Д <sub>2</sub> (альбумін)	84,1±3,63	92,41±3,34	79,31±3,90

Результати досліджень показали, що культивування клітин лінії НІНЗТЗ на нанопокритті з альбуміном і, особливо, біогелем сприяє високій життєздатності культури шляхом забезпечення інтенсивності клітинного дихання.

Отже, біогель на основі овальбуміну сприяє підвищенню проліферації, життєздатності та проліферативного індексу ембріональних фібробластів лінії НІНЗТЗ впродовж усього періоду культивування, тоді як нанопокриття скляної поверхні альбуміном не сприяє інтенсивному росту клітин.

Результати досліджень виявили зростання проліферації клітин яйцепроводів кролів на 24 год культивування у дослідній групі з біогелем у порівнянні з контролем та 2-ою дослідною групою, тоді як на 48 год культивування відмічається підвищення росту в обох дослідних групах (табл. 3.18).

Таблиця 3.18.

**Проліферативна активність клітин яйцепроводів кролів за культивування на біогелі та модифікованій поверхні з альбуміном, n=3;**

**M±m**

Група	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл через 24 год культивування	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл через 48 год культивування	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл через 72 год культивування
Контрольна	1,05±0,05	1,99±0,24	2,63±0,11
Д <sub>1</sub> (біогель)	1,39±0,12	2,52±0,09	4,25±0,07***
Д <sub>2</sub> (альбумін)	0,89±0,07	2,07±0,09	3,79±0,13**

Так, на 48 год культивування клітин яйцепроводів спостерігали підвищення рівня проліферації клітин у 1-й дослідній групі, за культивування на біогелі та у 2-й дослідній групі при використанні поверхні з альбуміном порівняно з контролем, хоча вірогідної різниці не виявлено.

Після культивування клітин яйцепроводів впродовж 3-ох діб відмічено вірогідне збільшення кількості клітин на 72-гу год культивування у 1-й ( $p<0,001$ ) та 2-й ( $p<0,01$ ) дослідних групах, порівняно до контрольної групи.

Індекс проліферації клітин на 24-ту год культивування був найвищим у 1-й дослідній групі, тоді як в контролі та 2-й дослідній групі величина показника була приблизно на одному рівні (табл. 3.19).

Аналогічна тенденція індексу проліферації зберігається і на 48-му год культивування. На 72-гу год культивування індекс проліферації зростає в усіх групах. Так, у 1-й та 2-й дослідних групах на 72-гу год відмічено підвищення у 1,6 та 1,4 разу індексу проліферації порівняно до показника контрольної групи.

Таблиця 3.19

**Ріст та індекс проліферації клітин яйцепроводів кролиць за культивування на біогелі та модифікованій наноповерхні з альбуміном,  $n=3$ ;  $M \pm m$**

Група	Тривалість культивування, год		
	24	48	72
	Загальна кількість клітин, млн/мл		
Контроль	1,05±0,05	1,99±0,24	2,63±0,11
Д <sub>1</sub> (біогель)	1,39±0,12	2,52±0,09	4,25±0,07***
Д <sub>2</sub> (альбумін)	0,89±0,07	2,07±0,09	3,79±0,13**
Індекс проліферації клітин			
Контроль	2,1	3,9	5,3
Д <sub>1</sub> (біогель)	2,8	5,0	8,5
Д <sub>2</sub> (альбумін)	1,8	4,1	7,6

Встановлено, що біогель викликає підвищення життєздатності та проліферативного індексу клітин яйцепроводів кролиць упродовж усього періоду культивування, тоді як нанопокриття скляної поверхні альбуміном проявляє менш помітний стимулювальний вплив на проліферативну здатність клітин [601].

У контролі ЛДГ активність у середовищі культивування клітин яйцепроводів на 24-ту год була найнижчою порівняно з дослідними групами (табл. 3.20). У контролі, 1-ій та 2-ій дослідних групах на 48-72 год культивування активність екстраклітинної ЛДГ знижувалась відносно її концентрації на 24-ту год, що пов'язано зі зростанням проліферативної активності клітин та їх високою життєздатністю [601].

Визначенням інтенсивності споживання глюкози клітинами яйцепроводів упродовж культивування встановлено: зниження її вмісту в кондиційному середовищі дослідних та контрольної груп на 48-му год

культивування в 2,5 раза та на 72-гу год культивування – в 12 разів, що вказує на високий рівень біосинтетичних процесів культури клітин усіх груп та посилений вуглеводний обмін у клітинах, що характеризує інтенсивний ріст клітин [601].

Таблиця 3.20.

**Активність ЛДГ та вміст глюкози у кондиційному середовищі за культивування клітин яйцепроводів на біогелі та модифікованій наноповерхні з альбуміном, n=3; M±m**

Група	Тривалість культивування, год		
	24	48	72
	ЛДГ, МО		
Контроль	50,5±0,73	32,2±0,29	11,1±0,22
Д <sub>1</sub> (біогель)	48,7±0,31	29,5±0,49**	9,03±0,51**
Д <sub>2</sub> (альбумін)	48,4±0,62	30,5±1,07	9,5±0,42*
Глюкоза, г/л			
Контроль	15,5±0,17	7,07±0,18	1,23±0,04
Д <sub>1</sub> (біогель)	16,9±0,07***	5,53±0,18**	0,97±0,03**
Д <sub>2</sub> (альбумін)	15,9±0,13	6,1±0,2***	1,05±0,07

Встановлено, що метаболічна активність клітин 1-ої дослідної групи впродовж усього періоду культивування була в межах 96,7-103,4 % і вищою за показники 2-ої дослідної групи (табл. 3.21).

Метаболічна активність клітин яйцепроводів на першу добу культивування в 2-ій дослідній групі була найнижчою, однак за подальшого культивування життєздатність клітин цієї групи зростала і знаходилась в межах 86,3-96,0 %.

Таблиця 3.21.

**Життєздатність клітин яйцепроводів за культивування на біогелі та модифікованій наноповерхні з альбуміном, n=3**

Група	МТТ, % від контролю		
	Термін культивування, год		
	24	48	72
Контроль	100	100	100
Д <sub>1</sub> (біогель)	101,97±4,36	102,10±3,78	96,96±0,93
Д <sub>2</sub> (альбумін)	86,40±4,34	96,49±2,09	95,63±1,05

Отже, біогель природнього походження та нанопокриття з альбуміном не викликають зниження адгезії та проліферативної активності культури клітин яйцепроводів [601].

Таблиця 3.22.

**Проліферативна активність клітин ендометрію за умов культивування на біогелі та модифікованій альбуміном наноповерхні, n=3; M±m**

Група	Концентрація клітин на 24 год культивування	Концентрація клітин на 48 год культивування	Концентрація клітин на 72 год культивування
Контроль	0,83±0,017	1,44±0,08	1,88±0,04
Д <sub>1</sub> (біогель )	1,32±0,04	1,75±0,06	2,6±0,01
Д <sub>2</sub> (альбумін)	1,01±0,08	1,5±0,09	2,08±0,04

При культивуванні клітин ендометрію відзначено зростання проліферативної активності на 24-ту год в обох дослідних групах – з біогелем на основі овальбуміну (1-ша дослідна група) та у 2-ій дослідній групі з нанопокриттям на основі альбуміну в порівнянні з контролем (табл. 3.22). На 48-му год культивування проліферація ріст клітин ендометрію у контролі та

2-й дослідній групі був однаковим, тоді як проліферативна активність клітин 1-ої дослідної групи зросла у 1,2 разів. На 72 год культивування виявлена тенденція до підвищення росту клітин у 1-ій та 2-ій дослідних групах у порівнянні до контролю.

Індекс проліферації клітин на 24-ту год культивування був найвищим у 1-ій дослідній групі, тоді як на 48-му год культивування цей показник був приблизно на одному рівні з контролем та 2-ою дослідною групою (табл. 3.23).

*Таблиця 3.23.*

**Індекс проліферації клітин ендометрію кролиць за умов культивування на біогелі та модифікованій альбуміном наноповерхні,  $n=3$ ;  $M \pm m$**

Група	Години культивування		
	24	48	72
Контроль	1,73	2,88	3,77
Д <sub>1</sub> (біогель )	2,62	3,5	5,2
Д <sub>2</sub> (альбумін)	2,03	3,0	4,16

На 72-гу годину культивування індекс проліферації зростає в усіх групах, однак, у 1-ій дослідній групі на біогелі відзначено значне зростання проліферативної активності клітин, що перевищує в 1,4 та 1,2 разу показники контролю та 2-ої дослідної групи. Проліферативна активність клітин 2-ої дослідної групи на нанопокритті з альбуміном поступово зростає впродовж досліджуваного періоду культивування і на 72-гу год культивування в 1,1 разу перевищувала показник контролю.

Рівень проліферації клітин ендометрію на 24-ту год культивування був найвищим у 1-ій дослідній групі у порівнянні з 2-ою дослідною групою (табл. 3.24). З 48-ої по 72-гу год культивування рівень проліферації зростає в обох групах, однак, у 1-ій дослідній групі з біогелем відмічено більш інтенсивне підвищення проліферативної активності клітин.

Таблиця 3.24.

**Рівень проліферації клітин ендометрію кролематок за умов культивування на біогелі та модифікованій альбуміном наноповерхні,  $(M \pm m)$ ,  $n=3$**

Дослідні групи	Години культивування		
	24	48	72
Д <sub>1</sub> (біогель)	1,5	1,2	1,4
Д <sub>2</sub> (альбумін)	1,2	1,04	1,09

Отже, встановлено, що біогель на основі овальбуміну викликає підвищення проліферації, життєздатності та проліферативного індексу клітин ендометрію впродовж всього періоду культивування, тоді як модифікація поверхні альбуміном проявляє стимулювальний вплив на культуру клітин на 72-гу год культивування [257].

Аналізом біохімічних показників кондиційного середовища культури клітин ендометрію після культивування на біогелі та модифікованій альбуміном наноповерхні, встановлено зниження активності ЛДГ в усіх групах упродовж культивування (табл. 3.25).

При визначенні динаміки обміну глюкози клітинами ендометрію впродовж культивування встановлено зниження її вмісту в кондиційному середовищі дослідних груп на 72-гу год культивування в 17,2 та 15,2 рази порівняно з кондиційним середовищем на 24-ту год культивування.

Це вказує на високий рівень біосинтетичних процесів культури клітин усіх груп та посилений вуглеводний обмін у клітинах у результаті інтенсивного росту.

Таблиця 3.25.

**Біохімічні показники кондиційного середовища за культивування клітин ендометрію кролиць на біогелі та модифікованій наноповерхні з альбуміном, n=3; M±m**

Група	Тривалість культивування, год		
	24	48	72
	ЛДГ, МО		
Контроль	51,11±0,93	32,63±0,51	11,63±0,49
Д <sub>1</sub> (біогель)	48,6±0,33	29,87±0,89***	9,07±0,056
Д <sub>2</sub> (альбумін)	48,5±0,67	30,1±0,6	9,13±0,38
Глюкоза, г/л			
Контроль	15,57±0,18	7,1±0,27	1,23±0,06
Д <sub>1</sub> (біогель)	16,87±0,18	5,63±0,2	0,98±0,06
Д <sub>2</sub> (альбумін)	15,86±0,15	6,23±0,2	1,04±0,04

Для встановлення впливу біогелю та альбуміну на культуру клітин ендометрію кролиць упродовж 72-ох годин культивування, проведено вивчення життєздатності за МТТ-тестом, що відображає інгібування клітинного дихання (табл. 3.26).

Таблиця 3.26.

**Життєздатність клітин ендометрію кролиць за культивування на біогелі та альбуміні, n=3**

Дослідні групи	МТТ, % від контролю		
	Термін культивування, год		
	24	48	72
Контроль	100	100	100
Д <sub>1</sub> (біогель )	123,1±4,77	111,3±6,17	135,6±3,74
Д <sub>2</sub> (альбумін)	115,98±3,99	90,73±3,23*	101,3±1,72*



Встановлено, що метаболічна активність клітин у 1-ій дослідній групі упродовж всього періоду культивування зростала до 121 %, 108,3 % та 126,5 % і була вірогідно вищою за показники 2-ої дослідної групи на 48 та 72 год культивування ( $p < 0,05$ ). Життєздатність клітин 2-ої дослідної групи також була високою і знаходилась в межах 117,4-87,7 %, а отже, нанопокриття з альбуміном не викликає зниження адгезії та проліферативної активності культури ендометрію.

Результати досліджень показали, що культивування клітин ендометрію на нанопокритті з альбуміном і, особливо, біогелем сприяє високій життєздатності культури, що підтверджують біохімічні показники кондиційного середовища та інтенсивність клітинного дихання (за МТТ-тестом).

**3.2.4. Повноцінність дозрівання ооцит-кумулясних комплексів кролиць у просторово-організованій культуральній системі клітин ендометрію, створеній на основі біогелю та нанопокриття з альбуміном.** З аналізу даних встановлено, що в 1-ій дослідній групі за умов культивування на культуральній системі клітин ендометрію, створеній на біогелі, кількість ініційованих до мейозу ОКК була найвищою, у порівнянні з іншими дослідними групами (табл. 3.27). Морфологічним критерієм досягнення ооцитом метафази-II є візуалізація полярного тільця. Після 24ох год культивування 76,7 % ооцитів 1-ої дослідної групи відновили мейоз і досягнули стадії метафази – II, тоді як кількість ооцитів з полярним тільцем у контрольній групі становила 63,3%. Культивування ОКК на нанопокритті з альбуміном (4-а дослідна група) викликає зниження мейотичного дозрівання, і лише 53,4 % ооцитів досягли стадії ооцита другого порядку.

Культивування ОКК на поверхні з альбуміном без фідерних клітин ендометрію (3-тя дослідна група) викликало відновлення мейозу у 46,7 % ооцитів, що пов'язано з дегенеративними змінами (зернистість цитоплазми, втрата округлої форми, вакуолізація) у 36,7 % ооцитів.

Таблиця 3.27.

**Дозрівання ОКК кролиць за різних умов культивування (n=30)**

Група	Класифікація ОКК, n (%)		
	добрі	Метафаза II	дегенеровані
Контроль (ОКК у ДМЕМ)	4 (13,3±6,31)	17 (56,7±9,20)	9 (30,0±8,51)
Д <sub>1</sub> (біогель+клітини+ОКК)	3 (10,0±5,57)	23 (76,7±7,85)	4 (13,3±6,31)
Д <sub>2</sub> (біогель+ОКК)	4 (13,3±6,31)	20 (66,7±8,75)	6 (20,0±7,43)
Д <sub>3</sub> (альбумін+ОКК)	5 (16,6±6,91)	14 (46,7±9,26)	11 (36,7±8,95)
Д <sub>4</sub> (альбумін+клітини+ОКК)	4 (13,3±6,31)	16 (53,4±9,26)	10 (33,3±8,75)
Д <sub>5</sub> (клітини+ОКК)	3 (10,0±5,31)	19 (63,3±8,95)	8 (26,7±8,21)

Узагальнюючи результати впливу нанопокриттів на дозрівання ОКК, відзначено стимулювальний вплив біогелю природнього походження та клітин ендометрію кролиць на мейотичне дозрівання ооцитів до метафази-II після 24-ох год культивування. Також позитивний ефект спостерігався в групах, де ОКК культивували лише на біогелі та тільки з клітинами ендометрію у порівнянні з контролем. Ефект співкультивування нанопокриттів з альбуміном на дозрівання ОКК як у присутності фідерної культури, так і за її відсутності, був найнижчим.

**3.2.5. Вплив об'ємної культуральної системи клітин яйцепроводів кролиць, створеної на основі біогелю та альбуміні, на дозрівання ранніх ембріонів до трансферабельних стадій.** За культивування 2-ох клітинних ембріонів на нанопокритті з біогелем через 24 год 33,3 % ембріонів знаходились на 4-х та 6-ти клітинних стадіях розвитку та 66,7 % – на 8-ми клітинній стадії (табл. 3.28).

Таблиця 3.28.

**Результати культивування 2-х клітинних ембріонів мишей на об'ємній культуральній системі клітин яйцепроводів кролиць**

Група	Характеристика адгезивної поверхні	Морфологічна характеристика ембріона, год		
		24	48	72
Контроль	15 ембріонів на 2-х клітинній стадії + ОС+ культура клітин яйцепроводів	2– 13,3% — 2 бластомерів в 9– 60% — 4-6 бластомерів 4 – 26,7% — 8 бластомерів	6–40%— 8 бластомерів 5– 33,3%— морули 1 – 6,7% — ранні бластоцисти 3 – 20% — зупинка розвитку	5– 33,3% — середні бластоцисти 1 – 6,7% — пізні бластоцисти 5 – 33,3% — аномальний розвиток бластоцист 4- 20% - загинули
Дослід 1	15 ембріонів на 2-х клітинній стадії + біогель + культура клітин яйцепроводів	5– 33,3 % — 4-6 бластомерів 10– 66,7% — 8 бластомерів	4 – 26,7 % — 8 бластом. 8– 53,3% — морули 2– 13,3% — ранні бластоцисти 1 – 6.7% — зупинка розвитку	7– 46,7% — середні бластоцисти 1–6,7% — пізні бластоцисти 2–13,3%— без прозорості оболонки 4 – 26,6% — аномальний розвиток 1– 6,7% — загинули

Продовження таблиці 3.28

Дослід 2	15 ембріонів на 2-х клітинній стадії + шкло+альбумін + культура клітин яйцепроводів	1 – 6,7% — 2 бластомерів 6 – 40% — 4-6 бластомерів 8 – 53,3% — 8 бластомерів	8 – 53,3% — 8 блстомерів 4 – 26,7% — морули 1 – 6,7% — ранні бласто- цисти 2 – 13,3% — зупинка розвитку	5 – 33,3% — середні бластоцисти 2 – 13,3% — пізні бластоцисти 1 – 6,7% — без прозорої оболонки 4 – 26,7% — аномальний розвиток бластоцист 3 – 20% — загинули
----------	---	--	--	--

Тоді як при культивуванні на нанопокритті з альбуміном 6,7% зародків залишились на стадії 2-х бластомерів проти 13,3 % – у контрольній групі. Відсоток ембріонів на стадії 8-х бластомерів був значно вищим (53,3 %) у 2-ій дослідній групі в порівнянні до контрольної – 26,7 % ембріонів досягнули 8-ми клітинної стадії [259]. Через 48 год культивування 53,3 % ембріонів у 1-ій дослідній групі знаходились на стадії морули, 26,7 % - на 8-ми клітинній стадії, а 13,3 % - ранньої бластоцисти. За культивування на нанопокритті з альбуміном більшість зародків – 53,3 % досягнули 8-ми клітинної стадії, 26,7 % розвинулись до морули та 6,7% – до ранньої бластоцисти.

За культивування на нанопокритті з альбуміном більшість зародків – 53,3 % досягнули 8-ми клітинної стадії, 26,7 % розвинулись до морули та 6,7% – до ранньої бластоцисти. На 48 год культивування у контрольній групі 40 % ембріонів знаходились на 8-ми клітинній стадії, 33,3 % досягнули морули та 6,7 % розвинулись до ранньої бластоцисти.

Через 72 год культивування ранні бластоцисти 1-ої дослідної групи з біогелем розвинулися в ескандовані та деякі бластоцисти вилупились з прозорих оболонок. Тоді як у контрольній і 2-ій дослідній групах кількість ембріонів, що досягнули стадії середньої бластоцисти була меншою, а у контрольній групі не спостерігалось хетчингу бластоцист [259]. Порівняння результатів розвитку 2-ох клітинних ембріонів у контрольній та дослідних групах показало, що при культивуванні на нанопокриттях з альбуміном, а особливо з біогелем позитивно впливає на життєздатність та на розвиток ранніх ембріонів *in vitro*, сприяє дробленню зародків, компактизації, диференціації клітин та формуванню бластоцист.

Аналізом біохімічних показників кондиційного середовища після культивування ембріонів на нанопокриттях з клітинами яйцепроводів встановлено зниження вмісту ЛДГ в усіх групах упродовж культивування (табл. 3.29).

Таблиця 3.29.

**Біохімічні показники кондиційного середовища за культивування  
2-х клітинних ембріонів миші на об'ємній культуральній системі клітин  
яйцепроводів кролиць**

Дослідна група	Термін культиву- вання, год	Біохімічний показник	
		ЛДГ	Глюкоза
		МО	г/л
Контроль (2-ох клітинні ембріони + ОС+ клітини яйцепроводів)	24	38,2±0,27	10,69±0,36
	48	27,4±0,67	9,0±0,28
	72	14,8±0,33	4,02±0,18
Дослідна 1 (2-ох клітинні ембріони + бігель + клітини яйцепроводів)	24	35,6±0,37**	9,31±0,54
	48	23,6±0,53*	8,55±0,36
	72	11,7±0,27**	2,61±0,31**
Дослідна 2 (2-ох клітинні ембріони + шкло+альбумін + клітини яйцепроводів)	24	35,4±0,57**	10,78±0,68
	48	24,7±0,20	7,99±0,14*
	72	12,7±0,30**	3,08±0,20*

Активність ЛДГ у кондиційному середовищі обох дослідних груп на 48-72 год культивування була нижчою в порівнянні з контрольною, однак вірогідних змін між групами не встановлено. При визначенні вмісту глюкози впродовж культивування ембріонів на клітинах яйцепроводу встановлено незначне її зменшення у кондиційному середовищі всіх груп на 48-му год культивування, тоді як на 72-гу год її концентрація знижувалась у 2,7, 3,6 та 3,5 разів, порівняно з кондиційним середовищем на 24-гу год культивування. Це пов'язано зі зміною метаболічної активності ембріонів після компактизації. З підвищенням рівня біосинтетичних процесів, зокрема посиленням вуглеводним обміном і додатковою потребою в енергії, ембріони на стадії морули та бластоцисти активно використовують глюкозу.

**3.2.6. Культивування 2-ох клітинних ембріонів миші в об'ємній культуральній системі клітин ендометрію кролиць на біогелі природнього походження та нанопокритті з альбуміном.** Результати морфологічної оцінки дозрівання 2-ох клітинних ембріонів миші на об'ємній культуральній системі клітин ендометрію кролиць, створеній на різних типах нанопокриттів, представлено у таблиці 3.30.

*Таблиця 3.30.*

**Вплив умов культивування 2-ох клітинних ембріонів мишей на об'ємній культуральній системі клітин ендометрію кролиць, створеній на різних типах нанопокриттів, на динаміку доїмплантаційного розвитку  
ранніх зародків (n=17)**

Група	Кількість ембріонів, які досягнули стадії, n(%)		
	6-8-ми клітин	морула	бластоциста
Контроль (ОС+ культура клітин ендометрію)	9 (52,94±12,47)	6 (35,29±11,95)	9 (52,94±12,47)
Дослід 1 (біогель +культура клітин ендометрію)	13 (76,47±10,60)	10 (58,82±12,30)	12 (70,58±11,39)
Дослід 2 (альбумін+культура клітин ендометрію)	11 (64,70±11,95)	8 (47,06±12,47)	10 (58,82±12,30)

При культивуванні ранніх зародків на нанопокритті з біогелем через 24 год 76,47 % ембріонів знаходились на 8-ми клітинній стадії та 64,70 % ембріонів за культивування на нанопокритті з альбуміном, тоді як у контрольній групі 8-ми клітинної стадії досягнуло 52,94 % ембріонів.

Таблиця 3.31.

**Біохімічні показники кондиційного середовища за культивування 2-х клітинних ембріонів миші на об'ємній культуральній системі клітин ендометрію кролиць**

Група	Термін культивування год	Біохімічний показник	
		ЛДГ	Глюкоза
		МО	г/л
Контроль (2-х клітинні ембріони + ОС+ клітини ендометрію)	24	46,2±0,27	15,07±0,24
	48	31,1±0,63	14,18±0,22
	72	16,8±0,23	6,07±0,15
Дослідна 1 (2-х клітинні ембріони + бігель + клітини ендометрію)	24	42,8±0,67**	14,85±0,13
	48	27,2±0,23**	9,85±0,18***
	72	13,8±0,20***	3,57±0,32**
Дослідна 2 (2-х клітинні ембріони + шкло+альбумін + клітини ендометрію)	24	47,2±0,30	15,34±0,05
	48	30,1±0,20	10,46±0,18***
	72	17,2±0,40	4,62±0,11**

Через 48 год культивування найвищий відсоток ембріонів на стадії морули 58,82 % отримали у 1-ій дослідній групі, тоді як за культивування на нанопокритті з альбуміном до морули розвинулось 47,06 % ембріонів та 35,29 % у контрольній групі. На 72 год культивування ембріонів на нанопокритті з біогелем отримано найвищу кількість бластоцист 70,58 %, тоді як у контрольній та 2-ій дослідній групах кількість ембріонів, що

досягнули стадії бластоцисти становила 52,94 % та 58,82 % відповідно. Це підтверджено біохімічними дослідженнями (табл. 3.31).

При визначенні активності ЛДГ та концентрації глюкози в кондиційному середовищі за умов дозрівання ембріонів на культурі клітин ендометрію встановлено, що культивування на різних наноповерхнях не викликало вірогідних змін рівня досліджуваних показників у кондиційному середовищі.

Результати досліджень даного розділу опубліковані у наукових працях [94, 145, 146, 148, 155, 227, 229, 252, 257, 259, 262, 535, 557, 558, 598, 601, 603].

### **3.3. Вплив екзогенних чинників на оогенез- та ембріогенез тварин**

Антропогенне навантаження на довкілля призводить до напруження адаптивних резервів організму, що зумовлює зниження відтворювальної функції, адже для більшості ксенобіотиків характерні гонадо- та ембріотоксичні властивості [91, 133]. Надмірна кількість важких металів призводить до зниження адаптаційних резервів організму, що є особливо важливими під час осіменіння, запліднення та вагітності. Клінічно це може проявлятися зниженням відтворювальної здатності самиць, порушенням статевого циклу, запліднення, овогенезу з наступними мутаціями, імплантаціями, розвитком ембріонів, ускладненим перебігом вагітності та пологів, появою викиднів, аномалій плоду [7].

Дослідження впливу сполук важких металів в умовах *in vitro* дозволяє реєструвати навіть незначні зміни на клітинному рівні, які проявляються у вигляді різних патологічних порушень на рівні організму, оскільки вивчення органоспецифічної дії сполук в умовах *in vivo* ускладнене структурною та функціональною гетерогенністю клітин організму [264]. Найбільш важливим у цьому аспекті є визначення цитостатичного та цитотоксичного (генотоксичного) ефекту, оскільки відомо, що ушкодження ДНК можуть



ініціювати злоякісне переродження клітин, а в разі змін ДНК у статевих клітинах виникає небезпека для здоров'я нащадків [215, 264].

Мета етапу – встановити особливості впливу кадмію, нікелю та купруму хлоридів на репродуктивну здатність тварин за їх надмірного надходження. Для скринінгового вивчення цитотоксичності сполук металів як тест-об'єкт застосовували клітини яйцепроводів та ембріональні фібробласти корів. Використання первинних культур клітин різних типів дозволяє провести експрес-оцінку впливу сполук, з'ясувати механізми дії на клітинному рівні та дослідити їх цито- та органоспецифічну токсичності.

**3.3.1. Цитотоксичний вплив кадмію хлориду на ембріональні фібробласти залежно від його тривалості.** У результаті досліджень виявлено вірогідне зниження кількості життєздатних епітеліальних клітин яйцепроводу за умов додавання до середовища кадмію хлориду в концентраціях 50 та 100 мкг/мл (табл. 3.32).

Таблиця 3.32.

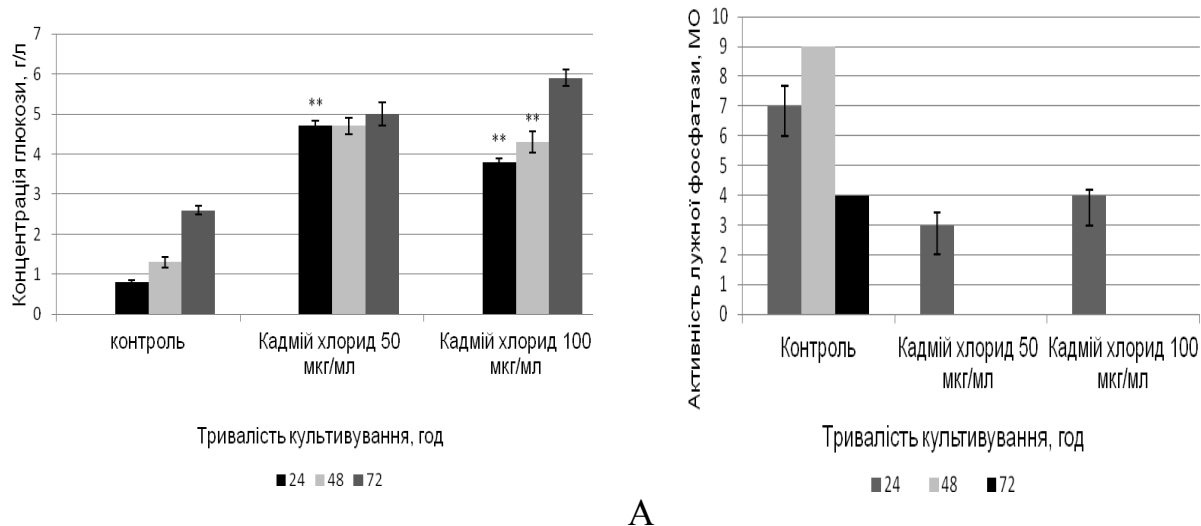
**Концентрація клітин яйцепроводів упродовж культивування за впливу кадмію хлориду, n=3;  $M \pm m$**

Група	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл через 24 год культивування	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл через 48 год культивування	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл через 72 год культивування
Контроль	$5,88 \pm 0,09$	$6,10 \pm 0,18$	$6,66 \pm 0,13$
Д <sub>1</sub> (кадмій хлорид, 50 мкг/мл)	$1,34 \pm 0,04^{**}$	$1,05 \pm 0,03^{***}$	$0,52 \pm 0,02^{***}$
Д <sub>2</sub> (кадмій хлорид, 100 мкг/мл)	$3,05 \pm 0,05^{**}$	$3,48 \pm 0,16^{**}$	$3,57 \pm 0,16^{**}$

Після 24-ох год культивування з кадмію хлоридом у концентрації 50 мкг/мл кількість життєздатних клітин зменшувалась у 4,38 раза, а через 48-72 години – у 12 разів у порівнянні з контролем.

Концентрація клітин яйцепроводів після культивування з додаванням кадмію хлориду 100 мкг/мл була на одному рівні впродовж усього періоду інкубації та в 2 рази нижчою за концентрацію клітин у контрольній групі.

Зниження життєздатності клітин яйцепроводів упродовж 72-ох год культивування у дослідних групах з концентрацією кадмію хлориду 50 та 100 мкг/мл підтверджено підвищенням концентрації глюкози у кондиційному середовищі порівняно з показниками контрольної групи (рис. 3.9).



**Рис. 3.9. Концентрація глюкози (А) та активність лужної фосфатази (Б) у кондиційному середовищі клітин яйцепроводів корів на 24, 48 та 72 год культивування після безперервного 72-ох годинного впливу кадмію хлориду.**

У дослідних групах її вміст у кондиційному середовищі впродовж культивування зростає. Так, у обох дослідних групах концентрація глюкози вірогідно підвищується на 24-ту год культивування відносно показника контрольної групи ( $p < 0,01$ ).

Встановлено, що у дослідних групах з додаванням кадмію хлориду активність лужної фосфатази після 24-ох год культивування знижується у 2 рази у порівнянні з контролем, тоді як через 48-ім та 72-ві год культивування її активність у кондиційному середовищі дослідних груп не виявлено, що вказує на повне блокування Кадмієм активності цього ензиму. Натомість активність лужної фосфатази у кондиційному середовищі контрольної групи впродовж культивування перебуває на високому рівні.

Тенденція до зниження обмінних процесів у дослідних групах за впливу кадмію хлориду підтверджувалась зниженням концентрацій Кальцію та Фосфору в кондиційному середовищі (табл. 3.33).

Таблиця 3.33.

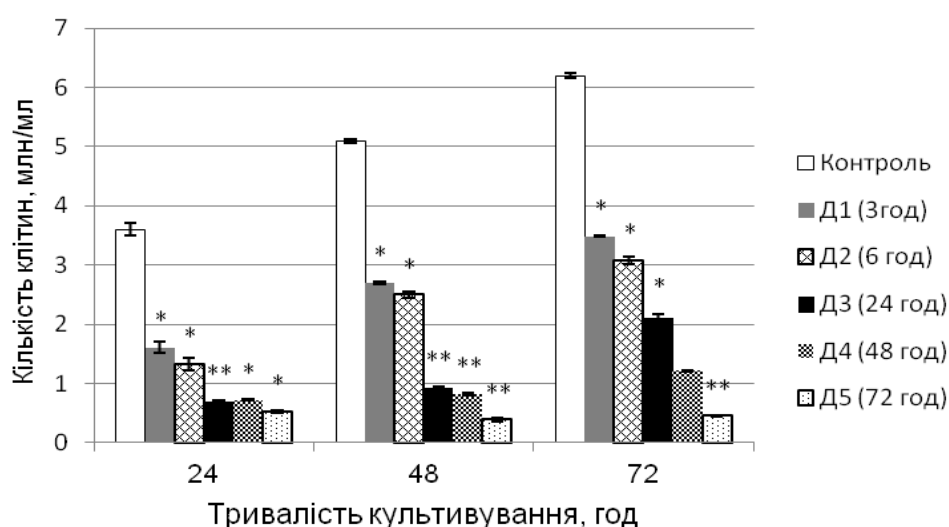
**Концентрація Кальцію та Фосфору у кондиційному середовищі клітин яйцепроводів корів за безперервного впливу кадмію хлориду,  $n=3$ ;  $M \pm m$**

Група	Тривалість культивування, год	Показник	
		Кальцій, ммоль/л	Фосфор, ммоль/л
Контроль	24	2,09±0,07	0,36±0,03
	48	1,91±0,17	0,57±0,05
	72	1,91±0,09	0,87±0,20
Д <sub>1</sub> (кадмію хлорид, 50 мкг/мл)	24	1,70±0,05	1,60±0,08
	48	1,84±0,12	1,00±0,27
	72	1,61±0,12	1,28±0,14
Д <sub>2</sub> (кадмію хлорид, 100 мкг/мл)	24	1,77±0,07	1,50±0,10
	48	1,79±0,08	0,96±0,06**
	72	1,47±0,10	1,06±0,10*

Інтенсивність споживання клітинами Фосфору за дії кадмію хлориду зменшується, про що свідчить вищий його рівень у кондиційному середовищі

дослідних груп у порівнянні з контролем. Проте вірогідна відмінність у концентрації Фосфору в кондиційному середовищі між контролем та дослідними групами відзначена лише на 72-гу год культивування. Додавання кадмію хлориду у досліджуваних концентраціях не позначилось на зміні концентрації Кальцію у кондиційному середовищі за інкубування клітин яйцепроводів. Після 72-ох год культивування у кондиційному середовищі контрольної та дослідних груп не встановлено вірогідних відмінностей у його концентрації [263].

На наступному етапі досліджень для визначення впливу часу експозиції досліджуваних сполук металів на ембріональні фібробласти корів через 3, 6, 24, 48 та 72 год культивування оцінювали проліферативну активність клітин, проводили заміну середовища на чисте і продовжували культивування до 72-ох годин (рис. 3.10).



**Рис. 3.10. Вплив часової експозиції кадмію хлориду на проліферативну активність ембріональних фібробластів.**

Порівняння результатів короткотривалого (3-24 год) та довготривалого (48-72 год) культивування ембріональних фібробластів з кадмію хлоридом виявили залежність токсичного впливу від тривалості дії сполуки.

Так, після короткотривалої експозиції сполуки кадмію впродовж 3-ох та 6-ти год (1 та 2 дослідна групи) спостерігали відновлення росту клітин вже на 2-гу добу культивування, порівняно з іншими дослідними групами з більш тривалою дією кадмію хлориду. Хоча стосовно контрольної групи ці показники були вірогідно ( $p < 0,001$ ) нижчими. Це вказує на можливість регенерації проліферативних процесів та функціональної здатності клітин після короткотривалого токсичного впливу Кадмію. У 3-ій дослідній групі культивування клітин з кадмієм хлоридом упродовж 24-ох год спричиняло гальмування проліферативної активності ембріональних фібробластів на перші 2 доби, тоді як на 3-тю добу кількість клітин зросла у 2,9 та 2,3 разів порівняно з показниками на 24-ту та 48-му год спостережень.

Таблиця 3.34.

**Вміст загального протеїну та Кальцію у кондиційному середовищі  
ембріональних фібробластів корів за різної експозиції кадмію хлориду,  
 $n=3$ ;  $M \pm m$**

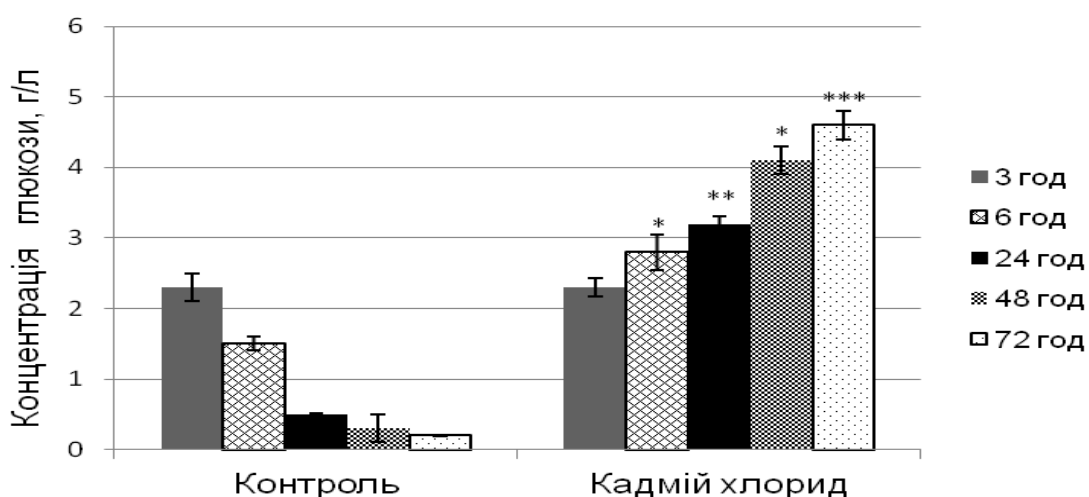
Група	Культивування, год	Показник	
		Загальний протеїн, г/л	Кальцій, ммоль/л
Контроль	3	12,70 $\pm$ 0,30	2,05 $\pm$ 0,15
	6	13,03 $\pm$ 0,20	2,12 $\pm$ 0,10
	24	13,81 $\pm$ 0,30	2,02 $\pm$ 0,05
	48	13,40 $\pm$ 0,25	1,90 $\pm$ 0,10
	72	12,90 $\pm$ 0,30	1,83 $\pm$ 0,30
Кадмій хлорид, 50 мкг/мл	3	12,40 $\pm$ 0,13	2,01 $\pm$ 0,13
	6	12,50 $\pm$ 0,20	2,20 $\pm$ 0,06
	24	12,80 $\pm$ 0,13*	1,83 $\pm$ 0,06
	48	12,40 $\pm$ 0,21*	1,90 $\pm$ 0,02
	72	11,60 $\pm$ 0,20*	1,57 $\pm$ 0,03

За тривалої дії кадмію хлориду впродовж 48-ми год у 4-ій дослідній групі спостерігали пригнічення росту клітин, тоді як у 5-ій дослідній групі за експозиції 72 год відбувається повне припинення проліферації клітин, що підтверджується результатами біохімічних досліджень.

Проведений біохімічний аналіз показників кондиційного середовища за умов додавання кадмію хлориду виявив, що вміст загального протеїну в контрольній групі впродовж усього періоду культивування не змінювався (табл. 3.34).

Тоді як вміст загального протеїну в дослідній групі на 24-ту, 48-му та 72-гу год спостереження вірогідно знижувався порівняно до аналогічних показників контрольної групи, що зумовлене зниженням проліферативної активності клітин за цитотоксичного впливу кадмію хлориду.

У контрольній і дослідній групах у кондиційному середовищі, відібраному на 3-тю год культивування, вміст глюкози був однаковим, тоді як на 6-ту год виявлено зниження на 1,5 разів концентрації глюкози у дослідній групі (рис. 3.11).

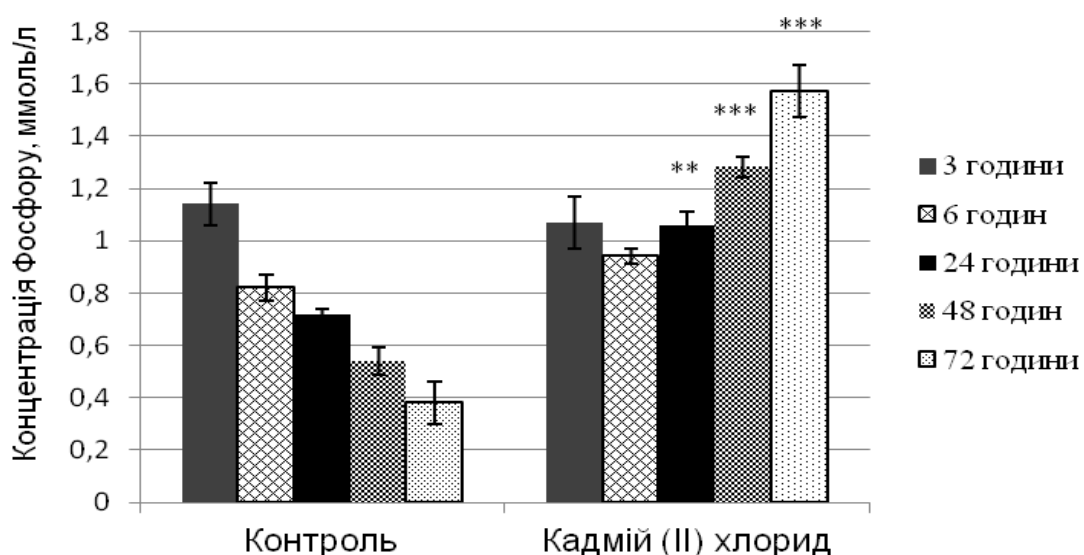


**Рис. 3.11.** Вплив різного часу експозиції кадмію хлориду на концентрацію глюкози у кондиційному середовищі ембріональних фібробластів корів.

Зниження рівня глюкози в контрольній групі зберігали впродовж 72-ох год культивування тоді, як у дослідній групі виявлено незначний рівень споживання глюкози, що характеризує зниження рівня біосинтетичних процесів.

Негативний вплив на клітини зумовлений здатністю йонів Кадмію за тривалої дії блокувати активність ензимних систем аеробного і анаеробного окиснення, інгібувати сульфгідрильні групи цистеїнових протеїназ, взаємодіючи з активними центрами ензимів [522, 651].

Зниження рівня обмінних процесів у дослідній групі за умов дії кадмію хлориду підтверджується також динамікою зміни концентрації Кальцію та Фосфору у кондиційному середовищі [263].

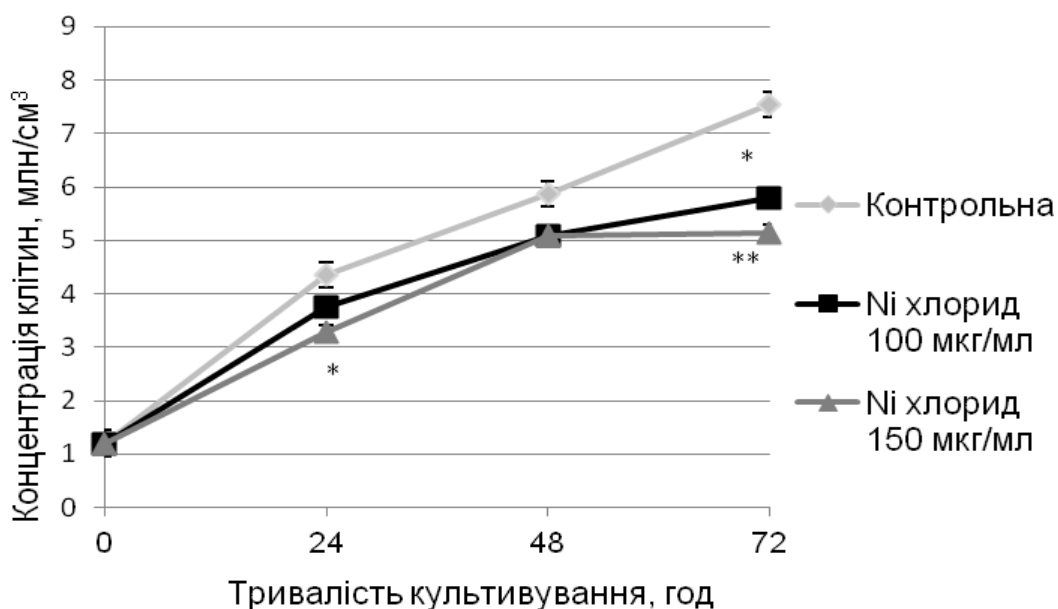


**Рис. 3.12. Вміст Фосфору у кондиційному середовищі за впливу різного часу експозиції кадмію хлориду на ембріональні фібробласти корів.**

На відміну від контрольної групи, рівень Кальцію у дослідній групі за додавання кадмію хлориду на 72-гу год знижується, а вміст Фосфору – вірогідно підвищується на 24-ту, 48-му та 72-гу год спостереження ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ), що співпадає зі зниженням росту клітин у ці періоди культивування (рис. 3.12). Із результатів дослідження зрозуміло, що кадмій

хлорид проявляє токсичний вплив на проліферативну активність та метаболічні процеси ембріональних фібробластів корів. Більш виражений цитотоксичний вплив кадмію хлориду на ембріональні фібробласти виявлено за тривалої дії сполуки (48-72 год).

**3.3.2. Зміни окремих біохімічних показників клітин яйцепроводів за дії хлоридів купруму та нікелю.** Дослідження кінетики росту клітин яйцепроводів за умов інкубування з нікелю хлоридом виявили, що обидві досліджувані концентрації знижують ріст клітин упродовж культивування (рис. 3.13).



**Рис. 3.13. Проліферація клітин яйцепроводів корів за впливу різних концентрацій нікелю хлориду.**

Так, на 24-ту год культивування кількість клітин у 2-ій дослідній групі була нижчою ( $p < 0,001$ ) порівняно з контрольною групою.

Після 48-ми год культивування в обох дослідних групах спостерігалась тенденція до зниження активності проліферативних процесів клітин яйцепроводів [264]. На 72-гу год культивування різниці між концентрацією



клітин контрольної та дослідними групами були вже значними ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ).

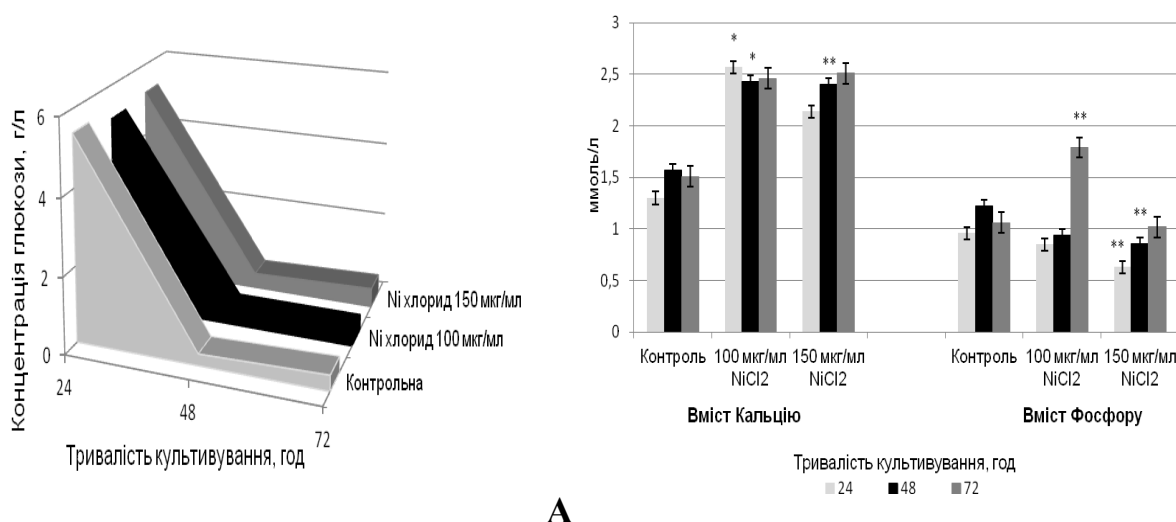
Результати проведених біохімічних досліджень показали, що вміст загального протеїну в культуральному середовищі впродовж 72-ох год культивування в обох дослідних групах знижується у порівнянні з контрольною групою (табл. 3.35). Виявлено вірогідне зниження вмісту глюкози впродовж культивування. Так, вміст глюкози після 24-ох год культивування становив 5,4 г/л у контрольній групі та 5,1 і 5,2 г/л у дослідних групах за використання нікелю хлориду в дозі 100 мкг/мл та 150 мкг/мл [264].

Таблиця 3.35.

**Вміст загального протеїну у кондиційному середовищі за інкубування клітин яйцепроводів з нікелю хлоридом,  $n=3$ ;  $M \pm m$**

Показник	Тривалість культивування, год		
	24	48	72
Загальний протеїн, г/л	Контроль		
	18,30 $\pm$ 0,48	13,70 $\pm$ 0,27	15,40 $\pm$ 0,30
	Д <sub>1</sub> (нікелю хлорид, 100 мкг/мл)		
	12,11 $\pm$ 0,21	14,70 $\pm$ 0,65*	14,30 $\pm$ 0,20*
	Д <sub>2</sub> (нікелю хлорид, 150 мкг/мл)		
	14,10 $\pm$ 0,33**	13,21 $\pm$ 0,23*	13,41 $\pm$ 0,24**

Через 48 та 72 год культивування вміст глюкози знижувався у дослідних та контрольній групі до рівня 0,3-0,5 г/л [264].



**Рис. 3.14. Показники метаболізму культури клітин яйцепроводів на 24, 48 та 72 год культивування за умов інкубації з нікелю хлоридом у різних концентраціях: (А) концентрація глюкози (г/л) та (Б) вміст Кальцію та Фосфору в кондиційному середовищі (ммоль/л).**

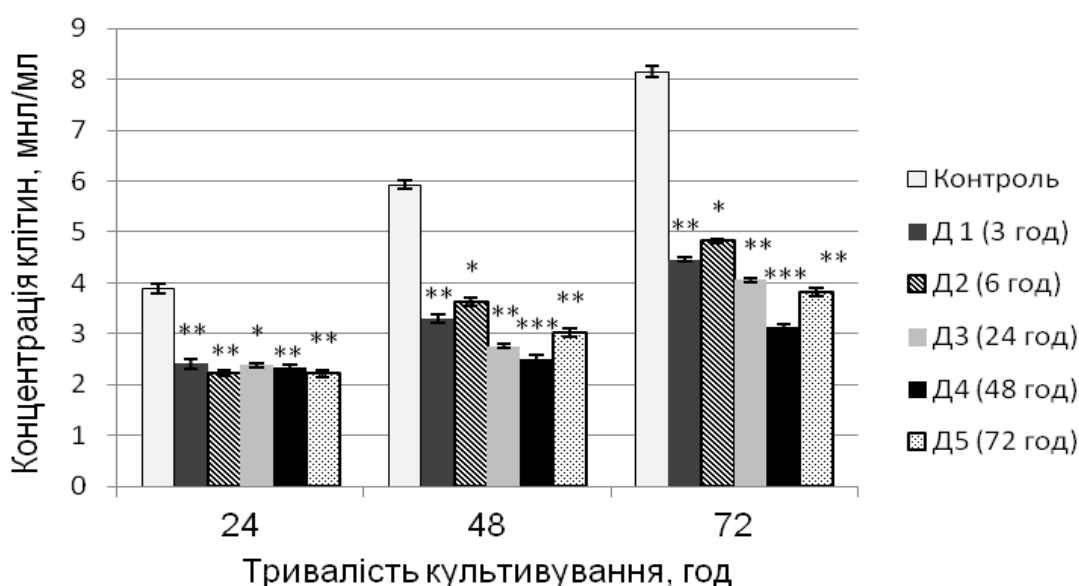
Виявлені зміни пов'язані з інтенсивним використанням глюкози як енергетичного субстрату клітинами за інтенсивного росту контрольної та дослідних груп упродовж 72 год культивування.

Після 24-48 год культивування спостерігали зниження вмісту Фосфору в дослідних групах порівняно з відповідним показником контрольної групи, причому в дослідній групі за експозиції вищої концентрації нікелю хлориду ці дані статистично вірогідні. Тоді як після 72-ох год культивування у дослідній групі за додавання 100 мкг/мл нікелю хлориду відзначено вірогідне зростання вмісту Фосфору стосовно контролю.

На відміну від контрольної групи, в обох дослідних групах спостерігали вірогідне підвищення вмісту Кальцію в кондиційному середовищі впродовж культивування. Так, вміст Кальцію в дослідній групі з додаванням 100 мкг/мл нікелю хлориду після 24 год культивування зростає у 1,97 разу, а через 72 год – у 1,63 разу порівняно з показником контрольної групи.

Очевидно, що йони Нікелю у високих дозах, блокуючи цитоплазматичні рецептори мембран, змінюють їх проникність, що призводить до виходу Кальцію з клітини, зниженню транспорту речовин з культурального середовища в клітину, зміни проліферативної активності клітин [264].

Для вивчення часової залежності впливу нікелю хлориду, ембріональні фібробласти інкубували у присутності солі нікелю впродовж 3, 6, 24, 48 та 72 год (рис. 3.15). Після 24-ох год культивування кількість життєздатних клітин знижувалась у 1,75 раза у всіх дослідних групах незалежно від тривалості інкубування клітин за присутності нікелю хлориду.



**Рис. 3.15. Вплив нікелю хлориду на проліферативну активність ембріональних фібробластів корів.**

За подальшого культивування спостерігали відновлення росту ембріональних фібробластів у всіх дослідних групах, однак їх концентрація була вірогідно нижчою порівняно з контролем. Найбільш суттєве відновлення функціональної здатності клітин спостерігалось за короткотривалої дії нікелю хлориду впродовж 3-ох та 6-ти год культивування.

Аналіз біохімічних показників кондиційного середовища за додавання нікелю хлориду показав, що вміст загального протеїну в кондиційному середовищі впродовж 72 год культивування у контролі дещо зростає впродовж культивування, тоді як в дослідній групі вміст загального протеїну не змінюється (табл. 3.36). Концентрація глюкози у кондиційному середовищі контрольної та дослідних груп упродовж культивування знижувалась, що вказує на високий рівень біосинтетичних процесів у ембріональних фібробластах, які потребують значних енергетичних затрат.

Таблиця 3.36.

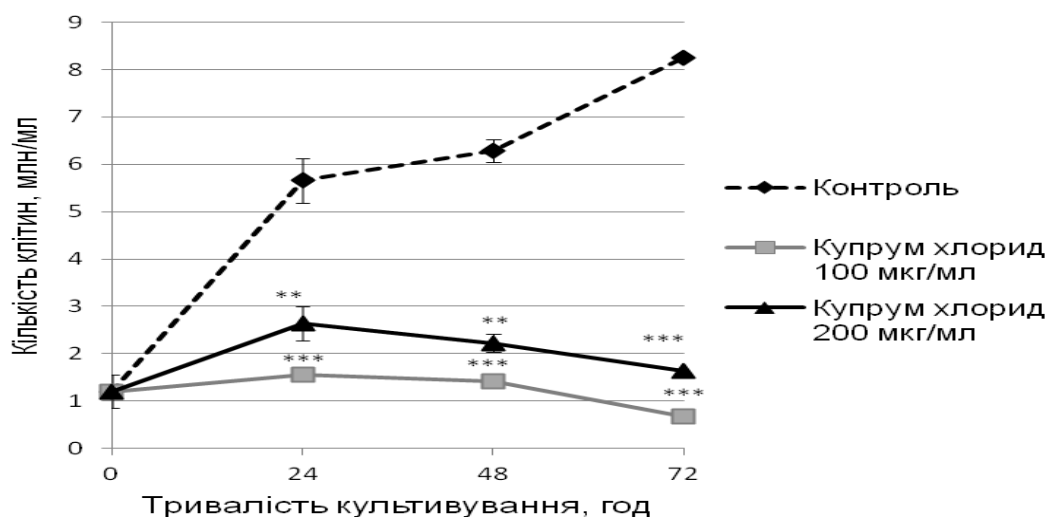
**Динаміка обмінних процесів ембріональних фібробластів корів  
упродовж культивування за впливу різного часу експозиції нікелю  
хлориду, n=3; M±m**

Група	Термін культи- вування, год	Біохімічний показник			
		Загальний протеїн, г/л	Глюкоза, г/л	Кальцій, ммоль/л	Фосфор, ммоль/л
Контроль	3	12,9±0,20	4,7±0,20	1,8±0,20	1,25±0,08
	6	13,4±0,30	3,3±0,10	1,63±0,10	1,22±0,07
	24	14,7±0,13	0,3±0,02	1,57±0,02	0,2±0,010
	48	14,5±0,20	0,1±0,03	1,81±0,05	0,4±0,02
	72	14,4±0,14	0,1±0,02	1,86±0,03	0,2±0,02
Нікелю хлорид	3	12,6±0,10	4,2±0,13	2,1±0,13	0,7±0,13*
	6	12,9±0,20	3,8±0,02**	2,0±0,05*	0,6±0,03**
	24	13,71±0,20*	0,6±0,13	1,9±0,20**	0,4±0,13
	48	13,20±0,20*	0,4±0,13**	1,9±0,05	0,8±0,13*
	72	12,9±0,10***	0,4±0,13**	1,9±0,15	0,7±0,13*

Проте у дослідній групі на 48-му та 72-ту год культивування виявлено вірогідно вищий вмісту глюкози, порівняно з величиною показника

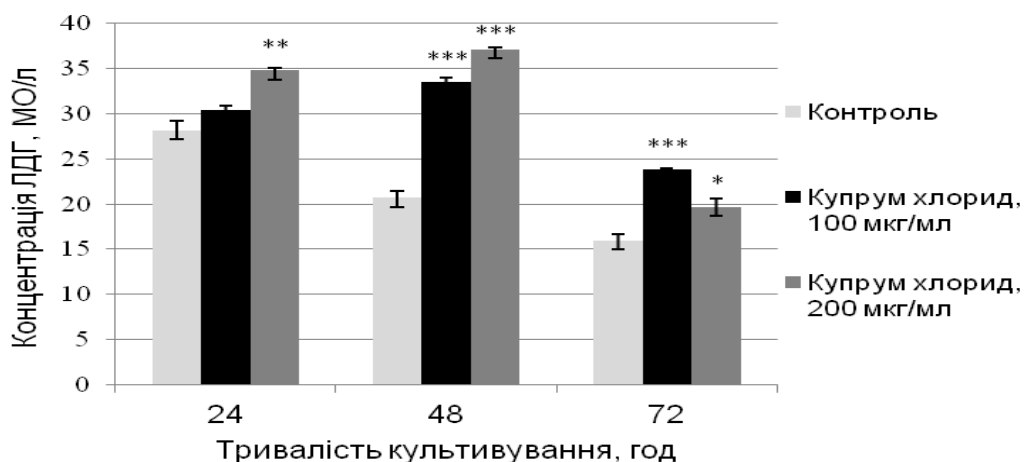
контрольної групи. Вміст Кальцію у кондиційному середовищі контрольної та дослідної груп не змінюється, тоді як інтенсивність споживання Фосфору на початку культивування зростає, а на 48-72 год культивування знижується.

Дослідження впливу високих концентрацій купруму хлориду на культуру клітин яйцепроводів виявило, що дози 100 та 200 мкг/мл вірогідно інгібували ріст клітин впродовж культивування (рис. 3.16).



**Рис. 3.16. Вплив купрум хлориду на проліферацію клітин яйцепроводів.** Клітини інкубували у присутності купруму хлориду у концентраціях 100 та 200 мкг/мл та порівнювали з контрольними клітинами.

Одним з маркерів, який об'єктивно дозволяє оцінити зміни метаболічного стану клітин є визначення активності у кондиційному середовищі цитозольного ензиму ЛДГ, що вказує на порушення цілісності клітинної мембрани. Результати досліджень виявили, що зі збільшенням тривалості культивування, активність ензиму змінювалась у кожній групі (рис. 3.17). У дослідних групах відмічено вірогідне підвищення концентрації ЛДГ на 48 та 72 год спостереження порівняно з величиною значень контрольної групи. Найбільш виражена зміна активності ензиму відзначена при використанні вищої концентрації купруму хлориду.



**Рис. 3.17. Активність ЛДГ у кондиційному середовищі за культивування клітин яйцепроводів за впливу різних концентрацій купруму хлориду.**

Низький росту клітин за умов додавання до середовища купруму хлориду був наслідком пригнічення обмінних процесів в культурі клітин (табл. 3.37).

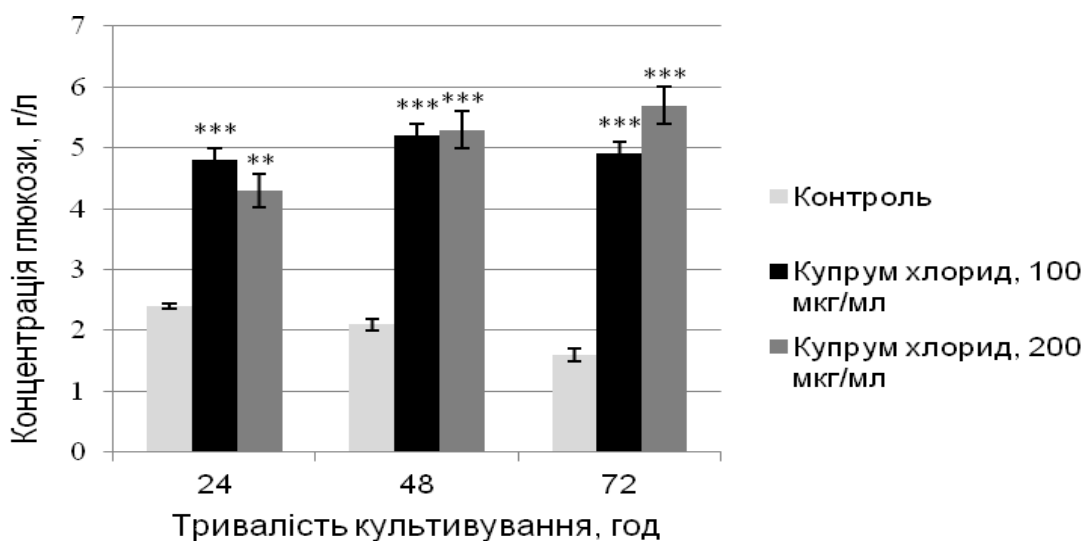
*Таблиця 3.37.*

**Вміст загального протеїну та активність лужної фосфатази у кондиційному середовищі при інкубації культури клітин яйцепроводів з купруму хлоридом впродовж 72 год культивування, n=3; M±m**

Група	Культивування, год	Показник	
		Загальний протеїн, г/л	Лужна фосфатаза, МО/л
Контроль	24	12,8±0,30	4,0±0,67
	48	14,1±0,27	4,0±0,37
	72	14,0±0,35	5,0±1,30
Д <sub>1</sub> (купрум хлорид, 100 мкг/мл)	24	13,2±0,42	1,0±0,10
	48	13,0±0,35	—
	72	13,2±0,30	—
Д <sub>2</sub> (купрум хлорид, 200 мкг/мл)	24	12,8±0,25	2,0±0,47
	48	12,9±0,20	—
	72	14,3±0,20	—

Встановлено, що в обох дослідних групах, незалежно від досліджуваної концентрації купруму хлориду, вміст загального протеїну суттєво не змінюється впродовж культивування. Із дослідження активності лужної фосфатази за впливу купруму хлориду встановлено зниження її активності в 1–2-ій дослідних групах після 24 год культивування в 2-4 разів, а через 48-72 год культивування її активність не виявляється.

Вміст глюкози у кондиційному середовищі дослідних груп залишається незмінною впродовж усього періоду культивування, у порівнянні з контролем, де концентрація глюкози знижується більше ніж у 12 раз (рис. 3.18), що можна пояснити властивістю йонів купруму викликати деполяризацію мембрани, знижуючи іонну асиметрію, інгібуючи K/Na-АТФазу, що блокує провідність мембрани, а, отже, і транспорт глюкози через мембрану.



**Рис. 3.18. Вплив купруму хлориду на вміст глюкози у кондиційному середовищі за культивування клітин яйцепроводів.**

При визначенні вмісту Кальцію та Фосфору за впливу додавання до культурального середовища купрум хлориду в дослідних групах відзначається зниження концентрації Кальцію, так як і в дослідних групах за впливу кадмій хлориду, що свідчить про зміну мембрано-зв'язаного Кальцію.

Інтенсивність споживання Фосфору клітинами за впливу купрум хлориду знижується, на що вказує його вищий рівень у кондиційному середовищі дослідних груп, порівняно з контролем, де він інтенсивно споживається, тому його рівень знижується вдвічі.

Отже, купрум хлорид у досліджуваних дозах знижує в клітинах епітелію яйцепроводів корів рівень глюкози, активність лужної фосфатази, змінює рівень Кальцію, знижує інтенсивність споживання Фосфору клітинами, у результаті чого сповільнюються обмінні процеси, як наслідок інгібується проліферативний ріст культури клітин.

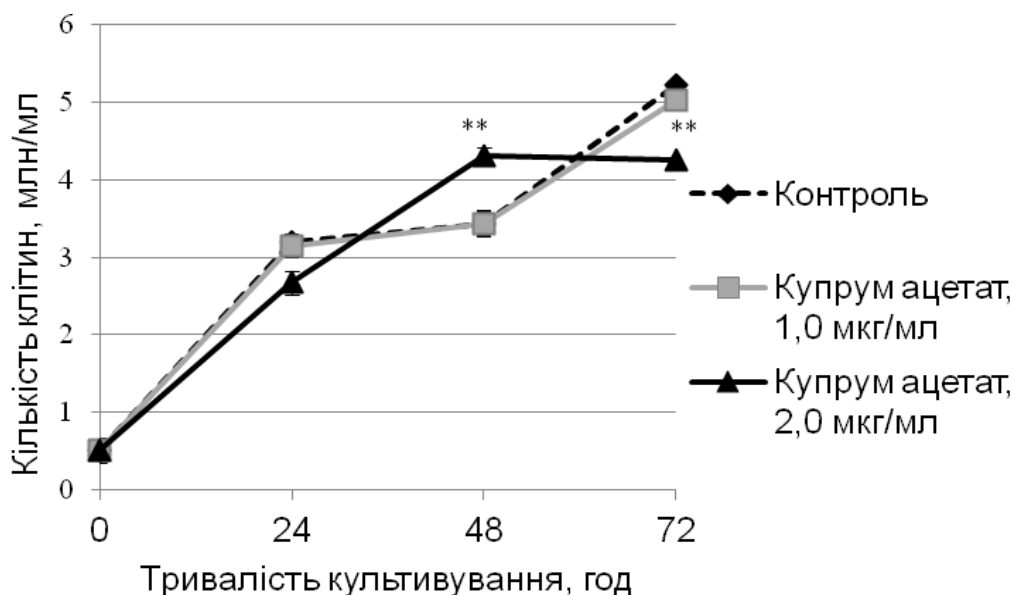
Таблиця 3.38.

**Вміст Кальцію та Фосфору у кондиційному середовищі за інкубування клітин яйцепроводів з купруму хлоридом,  $n=3$ ;  $M \pm m$**

Кальцій, ммоль/л	Тривалість культивування, год		
	24	48	72
	Контроль		
	2,42±0,21	2,08±0,17	2,02±0,09
	Д <sub>1</sub> (купрум хлорид, 100 мкг/мл)		
Фосфор, ммоль/л	1,93±0,22	1,44±0,10	1,61±0,10
	Д <sub>2</sub> (купрум хлорид, 200 мкг/мл)		
	1,98±0,07	1,91±0,08	1,67±0,58
	Культуральне середовище		
	1,42±0,04	1,42±0,04	1,42±0,04
Фосфор, ммоль/л	Контроль		
	0,58±0,13	0,76±0,14	0,56±0,10
	Д <sub>1</sub> (купрум хлорид, 100 мкг/мл)		
	1,55±0,22	1,57±0,20	1,58±0,28
	Д <sub>2</sub> (купрум хлорид, 200 мкг/мл)		
Фосфор, ммоль/л	1,02±0,07	1,69±0,27	1,66±0,30



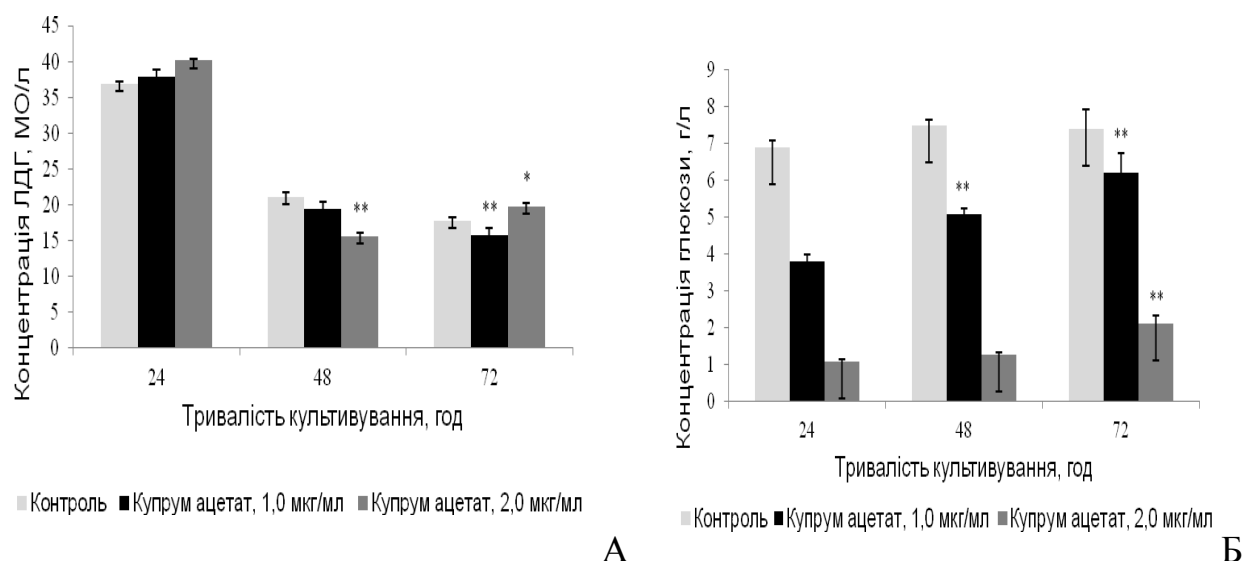
Отримані при вивченні впливу органічної сполуки – купрум ацетату у концентраціях 1,0 та 2,0 мкг/мл на культурі клітин яйцепроводів корів дані показали, що проліферативна активність клітин контрольної та дослідної групи за впливу сполуки у дозі 1,0 мкг/мл була на одному рівні впродовж 72 год спостереження (рис. 3.19).



**Рис. 3.19. Вплив купрум ацетату на проліферацію клітин яйцепроводів.**

Вірогідне зростання на 48-му год та зниження на 72-ту год культивування ( $p < 0,01$ ) концентрації клітин яйцепроводів стосовно показників контрольної групи відмічено за впливу купрум ацетату у вищій концентрації.

Результати досліджень показали, що купрум ацетат не проявляє цитотоксичної дії стосовно культури клітин яйцепроводів, що підтверджують біохімічні показники кондиційного середовища: зниження активності ЛДГ та концентрації глюкози впродовж 72 год культивування у всіх групах (рис. 3.20).



**Рис. 3.20. Вплив купрум ацетату на активність ЛДГ (А) та вміст глюкози (Б) у кондиційному середовищі за культивування клітин яйцепроводів.**

При дослідженні впливу низьких концентрацій купруму хлориду на епітеліальні клітини яйцепроводів цитотоксичного ефекту не встановлено. Додавання до культурального середовища купруму хлориду в дозах 0,001, 0,05 та 0,1 мкг/мл призвело до зниження проліферації клітин яйцепроводів на 24-ту год культивування в усіх дослідних групах, порівняно з контрольною.

Найбільш виражену інгібуючу дію на проліферативну активність культури клітин виявлено в групі, де до основного середовища додавали 0,1 мкг/мл купрум хлориду (табл. 3.39).

На 48-му год культивування у дослідній групі за концентрації купруму хлориду 0,01 мкг/мл відмічено стимулювальний вплив хлориду купруму на епітеліальні клітини яйцепроводів. За подальшого культивування до 72-х год при додаванні купруму хлориду концентрація клітин у дослідних групах знижується порівняно з контролем.

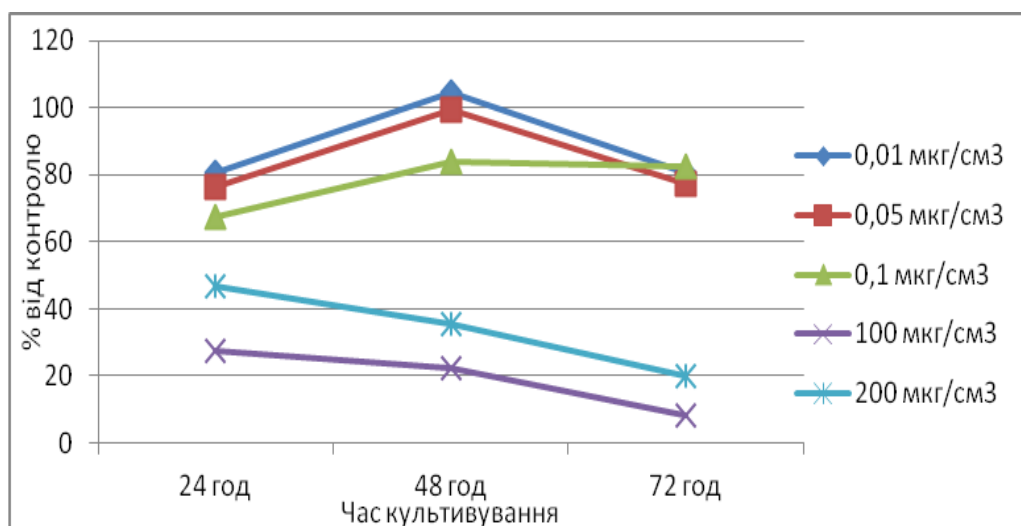
Таблиця 3.39.

**Концентрація епітеліальних клітин яйцепроводів за впливу малих  
концентрацій купруму хлориду, n=3; M±m**

Група	Концентрація клітин на 24 год культивування	Концентрація клітин на 48 год культивування	Концентрація клітин на 72 год культивування
Контроль	5,66±0,30	6,28±0,47	8,24±0,24
Д <sub>1</sub> (купрум хлорид 0,1 мкг/мл)	3,82±0,08**	5,28±0,07	6,79±0,10**
Д <sub>2</sub> (купрум хлорид 0,05 мкг/мл)	4,33±0,11**	6,23±0,07	6,38±0,10**
Д <sub>3</sub> (купрум хлорид 0,01 мкг/мл)	4,56±0,08**	6,56±0,11	6,62±0,08**

Скринінг в системі *in vitro* на культурі клітин яйцепроводів за кривими виживаності клітин порівняно з контролем виявив, що купруму хлорид у високих концентраціях проявляє виразну цитотоксичну дію стосовно культури клітин яйцепроводів, тоді як за низьких концентрацій сполуки, особливо за експозиції в дозі 0,01 мкг/мл спостерігалась тенденція до проліферації клітин (рис. 3.21).

На 48-му год культивування у дослідній групі за концентрації купруму хлориду 0,01 мкг/мл відмічено стимулювальний вплив хлориду купруму на епітеліальні клітини яйцепроводів. За подальшого культивування до 72-х год при додаванні купруму хлориду концентрація клітин у дослідних групах знижується порівняно з контролем.



**Рис. 3.21. Крива виживання (% від контролю) клітин яйцепроводів за впливу купруму хлориду.**

Для *in vitro* досліджень із застосуванням моделі органоспецифічних культур клітин актуальним є не тільки визначення цитотоксичної дії, але й порогової дози, яка не викликає токсичних ефектів. Тому наступним етапом наших досліджень було визначення максимальної концентрації купруму хлориду, які не викликають токсичного ефекту на клітини яйцепроводів (табл. 3.40).

*Таблиця 3.40.*

**Визначення максимально допустимої концентрації (МДК) купруму хлориду в культурі клітин яйцепроводів корів**

Культура клітин	n	Тестовані концентрації купруму хлориду, мкг/мл					МДК, мкг/мл
		0,01	0,05	0,1	100	200	
Клітини яйцепроводів	5	—	—	—	+	+	0,1

**Примітка:** n – повторність дослідів; «+» - дегенерація моношару клітин; «-» - моношар клітин без ознак дегенерації (через 96 годин).

Для визначення показників загальної токсичної дії в практиці токсиколого-гігієнічної оцінки ксенобіотиків, зокрема й солей важких металів, при проведенні досліджень *in vitro* на моделі культури клітин, визначають показники максимально допустимої концентрації (МДК) [131].

Встановлення максимально допустимої концентрації речовини у поживному середовищі, яка не викликає достовірних змін в ядерному апараті клітин та порушень проліферації клітинного моношару до 20% (за результатами тестів на загальну цитотоксичність), дає можливість характеризувати загальну токсичну та генотоксичну активність речовини [130, 131]. Порівняння результатів різної експозиції купруму хлориду показали, що максимальними концентраціями, встановленими для клітин яйцепроводів корів є 0,05 та 0,1 мкг/мл. За величиною цитопатичної дії на ембріональні фібробласти та клітини яйцепроводів корів досліджувані солі металів можна ранжирувати у наступному порядку:  $\text{CdCl}_2 < \text{CuCl}_2 < \text{NiCl}_2$ .

Отже, порівняльний аналіз цитотоксичного впливу важких металів на ембріональні фібробласти та клітин яйцепроводів корів виявив, що хлориди кадмію, купруму і нікелю у різних досліджуваних концентраціях викликають інгібування проліферативної активності клітин яйцепроводів корів, зниження функціональної активності культури, що підтверджується біохімічними показниками кондиційного середовища.

Також було встановлено залежність впливу сполук від їх дози та тривалості дії. Відновлення проліферативного росту клітин спостерігалось за короткотривалої дії кадмію хлориду впродовж 3-х та 6-ти год культивування, тоді як на 48-му та 72-гу год культивування кадмію хлорид майже пригнічує проліферацію клітин. Найбільш суттєве відновлення функціональної здатності культури клітин спостерігали за короткотривалої дії нікелю хлориду впродовж 3-х та 6-ти год культивування.

Клітини, що зазнали негативного впливу хлориду кадмію, купруму і нікелю, характеризуються зниженим споживанням глюкози, зміною регуляції гомеостазу цитозольного Кальцію та Фосфору, дисбалансом енергетичного

забезпечення, вибіркоким протеолізом ряду клітинних ензимів (ЛФ), що вказує на сповільнення обмінних процесів та викликає інгібування росту клітин.

Результати досліджень даного розділу опубліковані у [94, 194, 205, 207, 251, 263, 264, 596].

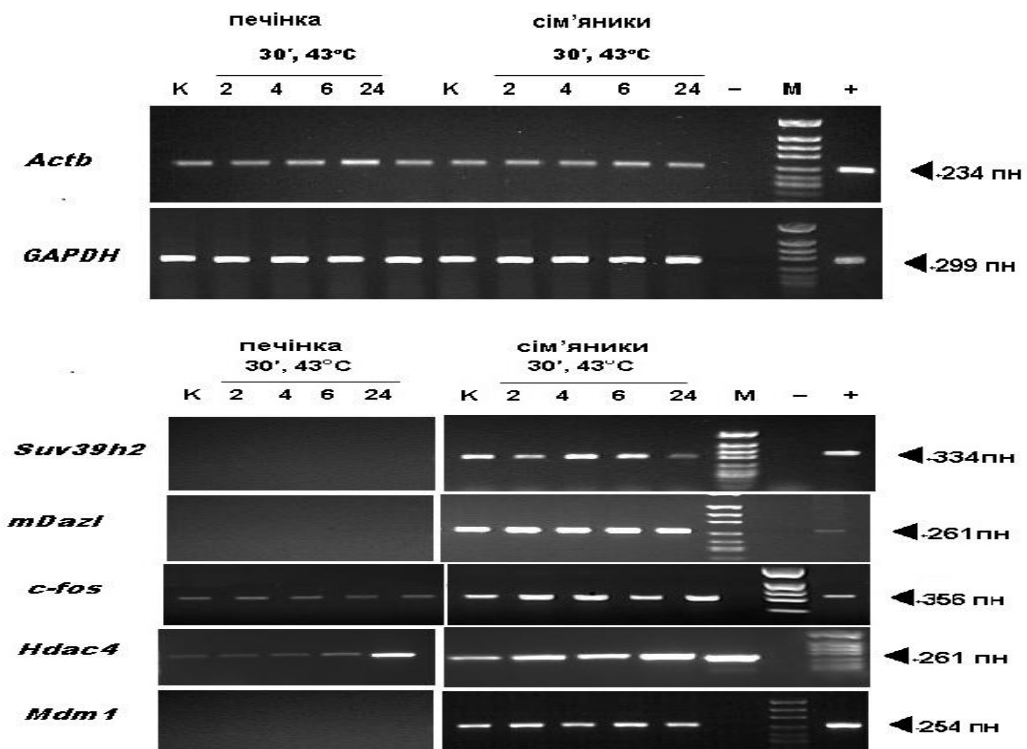
### **3.4. Вплив гіпертермії на сперматогенез миші**

Сперматогенез є одним з найбільш динамічних процесів, пов'язаних з клітинною регенерацією та диференціацією. Відомо, що сім'яники, завдяки високій проліферації гермінативних клітин, відносяться до температуро- та радіозалежних органів, однак відповідь статевих клітин на дію гіпертермії залежить від стадії сперматогенезу [76, 256]. Так, сперматоцити більш резистентні до підвищеної температури, а зрілі сперматозоїди, як носії генетичної інформації, є чутливішими і в них частіше виникають мутації [565]. Причини різної генетичної чутливості статевих клітин до гіпертермії на різних стадіях гаметогенезу до кінця не з'ясовані, а результати сучасних досліджень вказують на дії комплексу факторів – особливості метаболізму різних типів тканин, ступінь конденсації хромосом, рівень насичення клітин киснем, відносну тривалість стадій клітинного циклу, інтенсивність роботи систем репарації. Тому метою даного етапу роботи було дослідити зміни у соматичних та статевих клітинах самців мишей за умов теплового шоку методом ДНК-аналізу для діагностування генетичних порушень та корекції на первинному молекулярному рівні [256].

Для досліджень за об'єкт були підібрані представники різних груп генів, які відповідають за клітинний поділ (*ErbB-3*, *Mdm1*), сперматогенез та сперміогенез (*Dazl*, *Suv39h2*), регуляцію апоптозу (*Cideb*), транскрипцію та метаболізм (*Hdac 4*), гени теплового шоку.

**3.4.1. Рівень експресії окремих генів за теплового шоку.** Аналізуючи результати проведених досліджень впливу гіпертермії на експресію генів у

тканинах сім'яників і печінки мишей, всі вивчені гени згідно з транскрипційною активністю були поділені на 3 групи. До 1-ї групи входили гени, активність яких була виявлена у сім'яниках, тоді як у гепатоцитах їх експресія була незначною або відсутньою [256]. Так, до цієї групи було віднесено найбільшу кількість генів: *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, *c-fos*, *Hdac4* (рис. 3.22).



**Рис. 3.22. Рівень експресія генів *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, *c-fos*, *Hdac4* у тканинах печінки та сім'яників мишей через 2, 4, 6 та 24 год після гіпертермії.** Праворуч представлена електрофореграма фрагментів маркера молекулярної маси М, цифрами позначено розмір продуктів ПЛР у парах нуклеотидних залишків (п.н.), (+) – позитивний контроль, (-) – негативний контроль, реакційна суміш без додавання кДНК. Результати порівнювали до контролю з використанням праймерів специфічних до *Actb* та *GAPDH*.

Проте активність генів цієї групи дещо відрізнялася між собою. Так, висока активність гена *Suv39h2* відзначена після 4-х та 6-ти год, тоді як

експресія генів *mDazl* та *Mdm1* спостерігається вже через 2 год після гіпертермії. Часова залежність зміни активності відмічена також для генів *c-fos* та *Hdac4*.

Результати досліджень виявили тканинно-специфічний вплив гіпертермії на активність генів *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, *c-fos*, *Hdac4*. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР сім'яників показав наявність інтенсивних смужок продуктів тканинно-локалізованих генів *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, що свідчить про посилення експресії цих генів за теплового шоку у репродуктивних органах самців. Тоді як у продуктах ПЛР з печінки мишей, яких піддавали впливу гіпертермії, експресії цих генів не виявлено [256].

Отримані результати показали, що у відповідь на стрес активуються тканинно-специфічні гени. Зокрема у сім'яниках, на відміну від гепатоцитів, значно підвищується експресія гену *Dazl*, який відповідає за розвиток статевих клітин упродовж сперматогенезу і, зокрема зародкових клітин самців, сперматид та сперматогоніях. Аналогічні результати отримані щодо ще одного тканинно-специфічного гену, який експресується переважно у сім'яниках – гену *Suv39h2*. Цей ген належить до родини метилтрансфераз та впливає на організацію гетерохроматина у мейозі та задіяний у епігенетичному імпринтингу у зачатків чоловічих статевих клітин.

У наших дослідженнях виявлено активність онкогену *Mdm1* в сперматогенетичних клітинах та її відсутність в гепатоцитах. За експресією гену *Mdm1* в умовах стресу тканинно-специфічний контроль включає аналіз викликаних пошкоджень структурних компонентів клітини, що індукує транскрипцію генів, протеїнові продукти яких беруть участь у зупинці клітинного циклу та дозволяють клітині репарувати пошкодження ДНК чи запускати програму апоптозу.

Гіпертермія супроводжується зміною експресії позитивних та негативних регуляторів клітинного циклу. Нами встановлено, що транскрипція деяких генів ранньої відповіді, зокрема *Hdac4* в гепатоцитах майже не активується, за винятком 24 год після гіпертермії, тоді як у



сім'яниках відмічено зростання експресії цього гену впродовж досліджуваного періоду спостереження, що зумовлено вищою чутливістю статевих клітин до теплового шоку.

Дослідженнями встановлено, що гіпертермія викликає зміну транскрипції деяких генів ранньої відповіді, зокрема протоонкогену *c-fos*. Так, на відміну від тканини сім'яників, у гепатоцитах експресія гену *fos* репресована і майже не активується за теплового шоку [256], що пов'язано з формуванням компактної структури нуклеосоми в промоторі гену *c-fos*, викликане деацетилюванням гістонів [433]. До другої групи віднесено гени, експресія яких за теплового шоку виявлена в гепатоцитах та відсутня в сім'яниках (рис. 3.23).

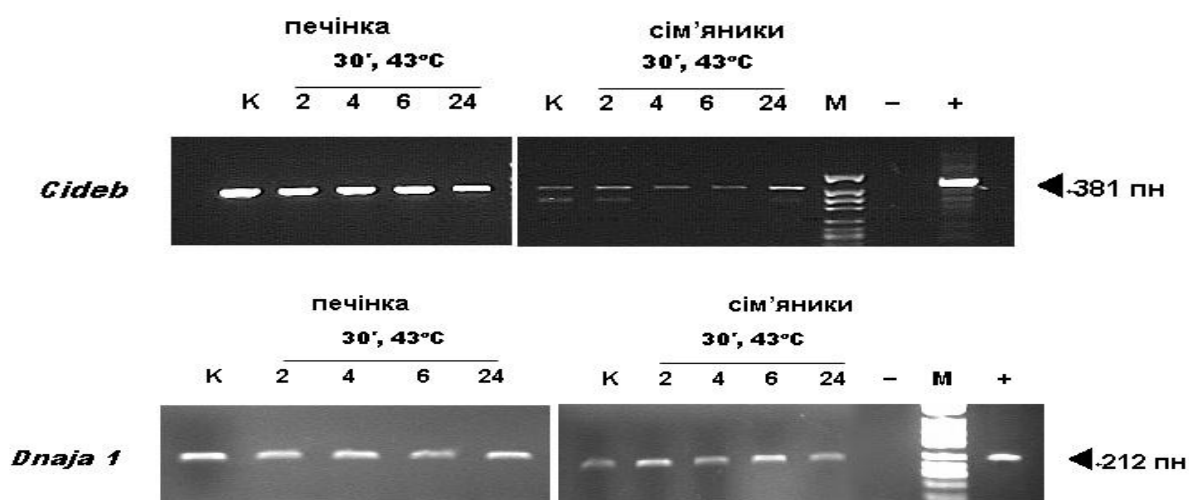
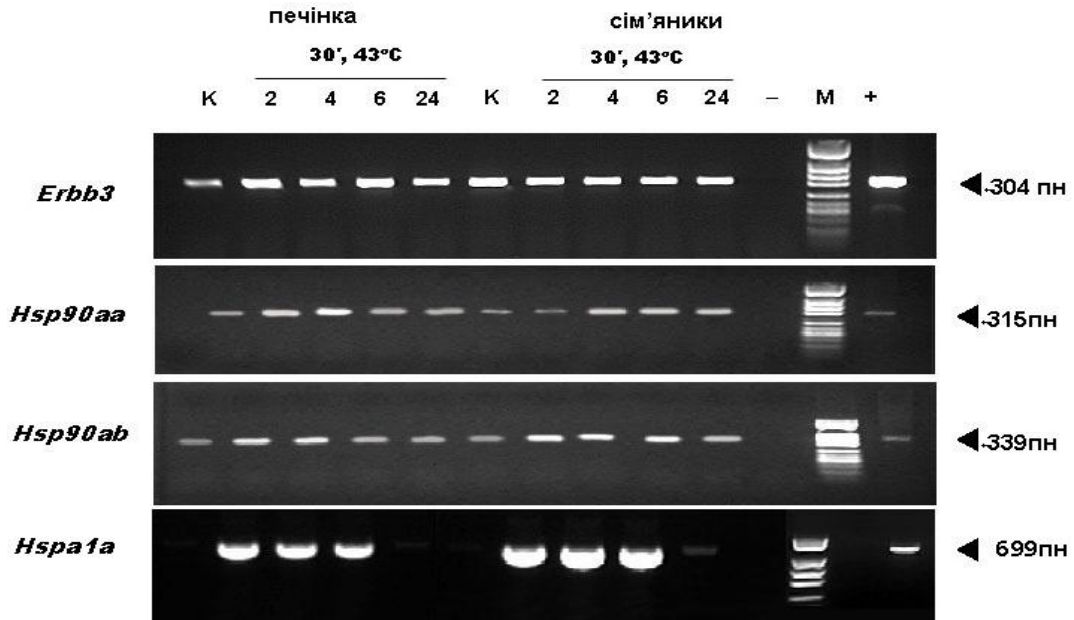


Рис. 3.23. Експресія *Cideb* та *Dnaja* у тканинах печінки та сім'яників мишей за гіпертермії. Тканини отримували на 2, 4, 6 та 24 год після теплового шоку.

Так, на відміну від сім'яників, у тканинах печінки відмічено активність генів *Cideb* та *Dnaja1* (Hsp40, підродина В білків теплового шоку, член 1) за гіпертермії.

До третьої групи входили гени теплового шоку та ген *Ebb1*, за гіпертермії в яких, відмічена експресія як у сім'яниках, так і в печінці. За

гіпертермії у гепатоцитах активність гену *ErbB1* зростає у порівнянні з контролем, тоді як у тканинах сім'яників експресія цього гену була однаковою як в контрольній групі, так і за дії теплового шоку (рис. 3.24).



**Рис. 3.24.** Експресія *ErbB1*, *Hps70i*, *Hsp90aa1*, *Hsp90ab1* у тканинах печінки та сім'яників мишей за гіпертермії. Тканини отримували на 2, 4, 6 та 24 год після теплового шоку.

Головну роль у захисті клітин від різних шкідливих факторів та підтримці гомеостазу всього організму на всіх стадіях його розвитку відіграє родина білків теплового шоку [256]. Відомо, що гени теплового шоку характеризуються швидкими та інтенсивними процесами активації транскрипції [386]. Отримані дані показали, що ген теплового шоку *Hsp70* експресується на низькому рівні і посилює експресію після гіпертермії в обох типах тканин, тоді як гени *Hsp90aa1* та *Hspab1* проявляють високу активність як до теплового шоку, так і у відповідь на підвищення температури [256]. Різна активність генів теплового шоку за гіпертермії вказує на те, що регуляція експресії кожного гену має свої особливості. Так, у дослідженнях в

обох тканинах відзначена вища експресія гену *Hsp90ab1* за температурного шоку, ніж гену *Hsp90aa1*. Ізоформи Hsp90 характеризуються тканинно- та органоспецифічною конститутивною експресією [613], що пояснює різниці в активності генів *Hsp90aa1* та *Hsp90ab1* на дію стресу.

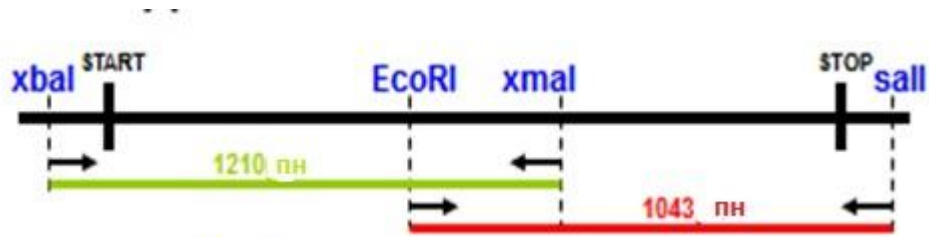
У стресових умовах, коли в клітині накопичуються білки з порушеною конформацією, Hsp90 частково переключається на їх фолдинг, зв'язуючись з білками та передаючи їх іншим шаперонам (зокрема Hsp70) для денатурації або протеосомам для протеолізу [256, 659]. Тепловий стрес індукує синтез в обох досліджуваних тканинах білків теплового стресу Hsp70.1, який виконує в клітині функцію молекулярного шаперону, захищає від пошкоджень і підтримує стабільність геному за умов стресу [73].

Дослідження експресії генів у печінці та сім'яниках мишей за гіпертермії дозволило порівняти експресію генів у соматичних та репродуктивних тканинах. Встановлено тканинно-специфічні зміни активності генів *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, *c-fos*, *Hdac4*, *Cideb* та *Dnaja1* після теплового шоку. Натомість в обох досліджуваних тканинах гіпертермія призводить до активації транскрипції генів теплового шоку. Диференціальна експресія генів за гіпертермії зумовлена здатністю різних типів клітин застосовувати декілька систем регуляції певних каскадів генів.

**3.4.2. Виявлення альтернативних сплайсинг-варіантів гена *Mdm1* у сім'яниках миші.** Серед досліджених генів 1-ої групи, які вибірково активуються у відповідь на гіпертермію у сім'яниках, найменш вивченим є ген *Mdm1*. Наявні декілька десятків посилань на роботи, які вивчали локалізацію, експресію та характеристику цього гену. Тому з метою детального дослідження впливу даного гена на сперматогенез проведено клонування гена *Mdm1* з використанням кДНК сперматоцитів в якості матриці.

Для клонування гена *Mdm1* було підібрано дві пари праймерів: сенсовий праймер, що містив сайт рестрикції ендонуклеази *XbaI* і

антисенсовий праймер з сайтом розпізнавання для рестриктази *Sall*, стоп-кодон (рис. 3.25).



**Рис. 3.25. Розміщення праймерів та загальна схема клонування гена *Mdm1*.**

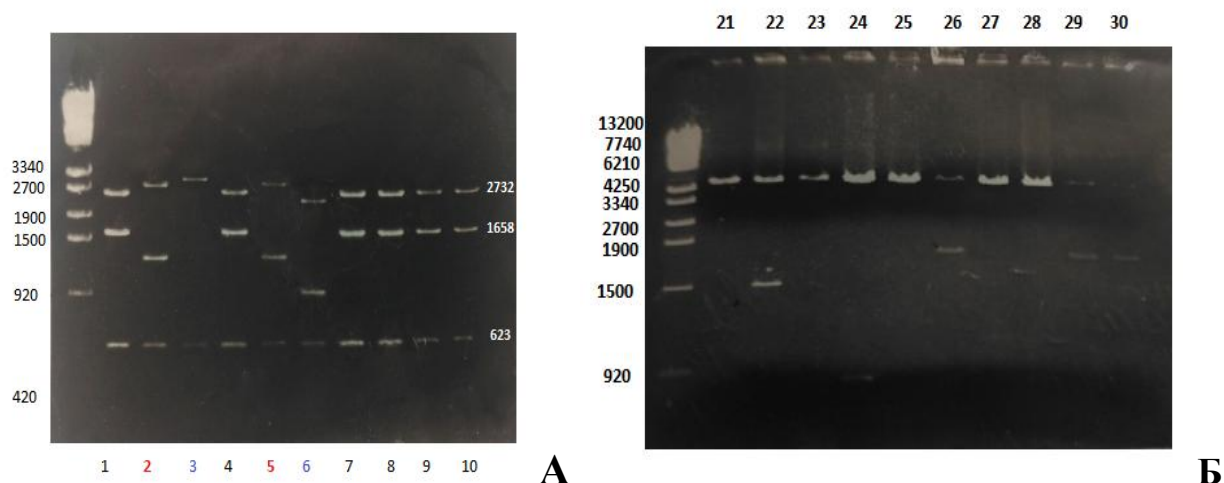
Ампліфіковано два фрагменти гена *Mdm1*, розмір продуктів яких складав 1043 (Mdm1XbaIF) та 1210 п.н. (Mdm1Sall R) (табл 3.41).

*Таблиця 3.41.*

**Характеристика праймерів використаних у роботі**

Назва праймера	Послідовність праймера
Mdm1XbaIF	tcTAGagcgcagggcgacat
Mdm1R1183	tctcggagctccttaacctg
Mdm1 F1051	Gacaccaaaaggcttgga aaa
Mdm1Sall R	gTCgaCccagctgtcactaga

Кожен з ампліфікованих фрагментів кДНК окремо було клоновано по сайтах *Xba* та *Sall* відповідно у вектор pCR II-Торо (Invitrogen). Будову отриманих плазмід pCR II-Торо*Mdm1XbaI* та pCR II-Торо*Mdm1Sall*, аналізували рекстикційним картуванням (рис. 3.26).



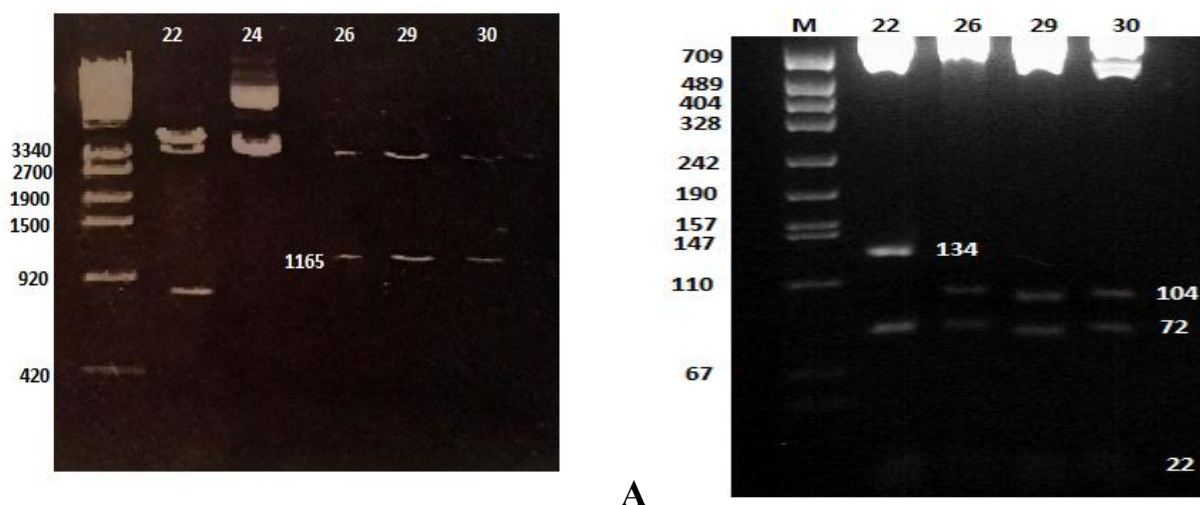
**Рис. 3.26. Електрофореграма фрагментів:** А – плазмиди рCR II-Торо*MdmI**XbaI* після розщеплення ендонуклеазами рестрикції *EcoRI* та *StyI* (колонії 1-10); Б – плазмиди рCR II-Торо*MdmSalI* після рестрикції ензимом *EcoRI* (колонії 21-30). Розмір фрагментів вказано у п.н.

З результатів рестрикційного аналізу плазмиди рCR II-Торо*MdmI* *XbaI* (рис. 3.26, а) видно, що після обробки ендонуклеазами рестрикції *EcoRI* та *StyI* у зразках 1,4, 7,8, 9, 10 утворились три фрагменти розміром 2732 пн, 1658 пн, 623 пн (рис. 3.26, а, доріжки 1, 4, 7,8, 9, 10), що відповідає сайтам впізнавання рестриктаз *EcoRI* та *StyI* для отриманої плазмиди. Тоді як у зразках 3 та 6 вищезгаданих фрагментів не виявлено, що вказує на відсутність у плазмиді рCR I-Торо клонованого фрагменту *MdmI**XbaI*. Натомість лінеаризація плазмиди рCR II-Торо*MdmI**XbaI* цими ензимами призвела до отримання фрагментів розміром 3080 пн, 1305 пн та 623 пн у зразках 2 та 5, що відповідає розміру цієї плазмиди у випадку лігації клонованого фрагменту *MdmI**XbaI* у правосторонній позиції.

Аналіз отриманих електрофоретичних продуктів плазмиди рCR II-*MdmSalI* після рестрикції ендонуклеазою *EcoRI* показав наявність фрагментів очікуваного розміру у зразках 22, 24, 26, 29, 30 (рис. 3.26, б).

Для додаткового скринінгу ці зразки плазмиди рCR II-Торо*MdmSalI* піддавали дії рекстриктаз *SalI* та *Sma I* (рис. 3.27, а). Результати рестрикційного аналізу дозволили виявити відсутність клонованого

фрагменту *MdmSalI* у зразку 24, тоді як у решти зразків розмір фрагментів відповідав плазміді.



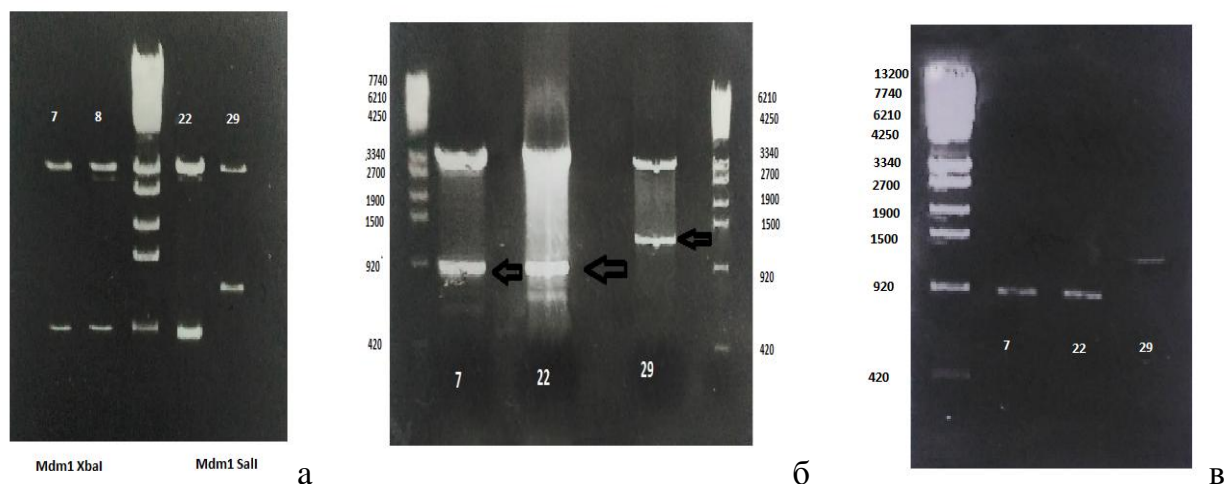
**Б**

**Рис. 3.27.** Електрофоретичний розподіл продуктів рестрикції відібраних колоній 22, 24, 26, 29, 30 рекомбінантної плазмиди рCRП-Торо з *MdmSalI* фрагментом після розщеплення ендонуклеазами рестрикції *SalI* та *SmaI* (рис А) та рестриктазами *EcoRI* та *SacI* (рис. Б).

Для з'ясування відмінності нуклеотидної послідовності клонів 22, 26, 29, 30 зі *MdmSalI* фрагментом проведена додаткова обробка ендонуклеазами рестрикції *SacI* та *EcoRI*. Отримана нами плазміда рCR II-Торо*MdmISalI* містить один сайт впізнавання для ендонуклеази рестрикції *EcoRI* та два – для *SacI*. Після розщеплення плазмиди рCR II-Торо*MdmISalI* цими ендонуклеазами отримано чотири фрагменти розміром 1072 пн, 134 пн, 72 пн, 22 пн для клону 22 та 1072 пн, 104 пн, 72 пн, 22 пн для клонів 26, 29 і 30, що відповідає фізичній карті цієї плазмиди. Різниця у 30 пн у другому фрагменті між клонами, дозволяє стверджувати, що клон 22 містить екзон VII, тоді як клони 26, 29 та 30 сконований без екзону VII (рис. 3.27, б).

Для подальшого клонування відібрано зразки 7 та 8 з першою вставкою *Mdm1XbaI* та зразки 22 і 29 зі вставкою *Mdm1SalI*. Для побудови

рекомбінантної плазмиди рМЕV-2НА*Mdm1* отриманий вектор рCR II-Торо*Mdm1XbaI* обробляли ендонуклеазами рестрикції *EcoRI* і *XbaI*, а плазмиду рCR II-Торо*Mdm SalI* - рестриктазами *EcoRI* та *SalI*. Елюйовані фрагменти, що містили ген *Mdm1* з'єднували через *EcoRI*.



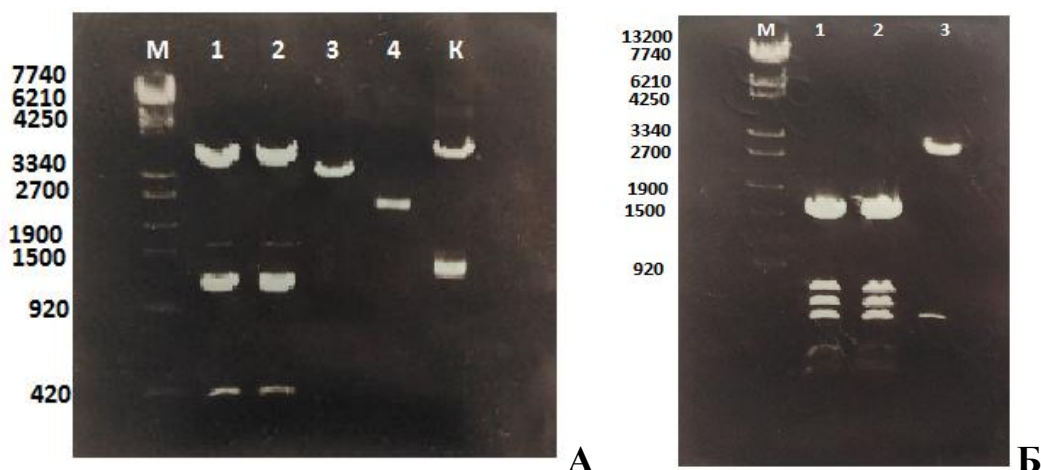
**Рис. 3.28. Електрофоретичне розділення продуктів рестрикції зразків 7 та 8 першої вставки *Mdm1 Xba* після ензимів *EcoRI* і *XbaI* та зразків 22,29 другої вставки *Mdm1 SalI*, оброблених рестриктазами *EcoRI* та *SalI* (а). Нанесення на гель оброблених плазмід рCR II-Торо*Mdm1XbaI* та рCR II-Торо*MdmSalI* після розщеплення ендонуклеазами рестрикції для елюції фрагментів зразків 7, 22 та 29 на мембрану (б). Скринінг вставок після ізоляції (в).**

Вектор рМЕV-2НА (Biomux Technology, США) обробляли ендонуклеазами рекстрикції *XbaI* та *SalI* та проводили лігування з елюйованими фрагментами.

Для лігації до плазмідного вектора рМЕV-2НА було використано клон 7 першої вставки *Mdm1 Xba* та другої вставки *Mdm1 SalI* клон 22 та 29. Після трансформації клітин *E.coli* клонованими плазмідними конструкціями отримано 4 колонії. Правильність клонування та збереженість рамки зчитування підтверджували подальшим картуванням виділених плазмід за



допомогою рестриктаз XhoI та StyI (рис. 3.29). Рестрикція ендонуклеазою XhoI 4 клонів, виділених із відібраних трансформантів, показала наявність ставок різного розміру (рис. 3.29, А).



**Рис. 3.29. Рестрикційний аналіз плазмиди pMEV-2HAMdm1 :** А – 1-4 – після розщеплення ендонуклеазою рестрикції XhoI, К - плазмиди pMEV-2HA; Б – після обробки рестриктазою StyI.

Як контроль використано вектор pMEV-2HA. Результати встановили, що тільки два перші клони містять рекомбіновану плазмиду зі вставкою гена *Mdm1*, оскільки після обробки плазмиди ендонуклеазою рестрикції XhoI утворюються три фрагменти розміром 4730 пн, 1264 пн, 400 пн, що вказує про наявність трьох сайтів впізнавання для XhoI в отриманій плазміді. Для підтвердження даної версії було проведено додаткову обробку трьох клонів рестриктазою StyI. Вектор, який містить повнорозмірний ген *Mdm1*, містив додатково три вставки, на відміну від плазмиди pMEV-2HA без вставки.

Для ідентифікації виявлених варіантів клонованих генів нами було проведено їхнє секвенування. Аналіз отриманих послідовностей показав, що виявлений варіант клонованої вставки 1 є альтернативним сплайс-варіантом 3 мРНК гену *Mdm1* (Асс. No: NM\_001162904). Результати проведених досліджень свідчать про наявність у тканинах миші альтернативних сплайс-



варіантів мРНК гена *Mdm1*. Можна припустити, що в результаті гіпертермії в тканинах яєчок утворюються ізоформи гена *Mdm1* із різними регуляторними С-кінцевими послідовностями та різними можливостями регуляції їхньої активності шляхом апоптозу. У тканинах мишей за дії теплового шоку виявлено ряд нових альтернативних сплайс-варіантів мРНК *Mdm1*. Функціональна роль ізоформ гена *Mdm1*, їх локалізація в різних тканинах та умови синтезу потребують подальшого вивчення для з'ясування механізмів апоптозу та розробки можливих підходів до його регуляції для створення антипухлинних препаратів.

Для з'ясування ефективності експресії створеної генетичної конструкції рMEV-2НА*Mdm1* на рівні протеїну, проводили тимчасову трансфекцію клітин RetroPackPT67 (Cat. No. 631510) плазмідною конструкцією, яка містить ген *Mdm1*. Детектування наявності протеїну *Mdm1* у культуральному середовищі клітин-продуцентів RetroPackPT67 проводили за допомогою вестерн-блот аналізу.



**Рис. 3.30. Результати вестерн-блотингу з визначення вмісту білка *Mdm1* у клітинах RetroPackPT67 після трансфекції клітин плазмідною рMEV-2НА*Mdm1*, що містить ген цього білка.**

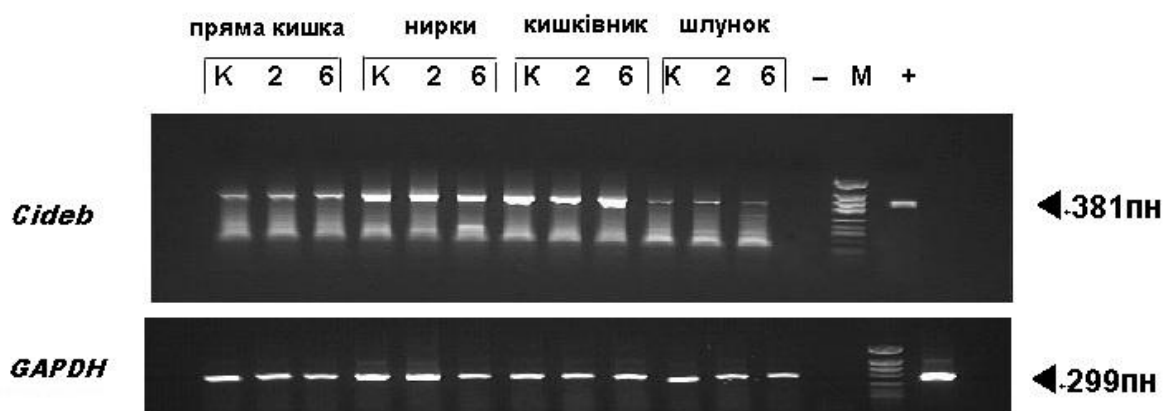
**Примітка.** Рівень експресії  $\beta$ -актину використовували як внутрішній контроль рівномірності нанесення протеїнів при електрофорезі.

Результат вестерн-блот аналізу засвідчив наявність протеїнового продукту гену *Mdm1* у культуральному середовищі клітин, трансфікованих

генетичною конструкцією рMEV-2HAMdm1, що підтвердив можливість використання створеної генетичної конструкції для еукаріотичної експресії.

**3.4.3. Експресія гена *Cideb* у тканинах самців миші за впливу теплового шоку.** Наступним етапом наших досліджень було визначення тканинно-специфічних особливостей експресії гена *Cideb* у мишей самців на дію локальної гіпертермії.

Отримані результати дають можливість виявити відмінності експресії гена *Cideb* за одноразової гіпертермії середнього ступеню у печінці, нирках, шлунку, кишківнику, товстій кишці. Так, експресія гена у печінці, нирках та кишківнику вища, ніж у шлунку та товстому кишківнику (рис. 3.31; 3.32).

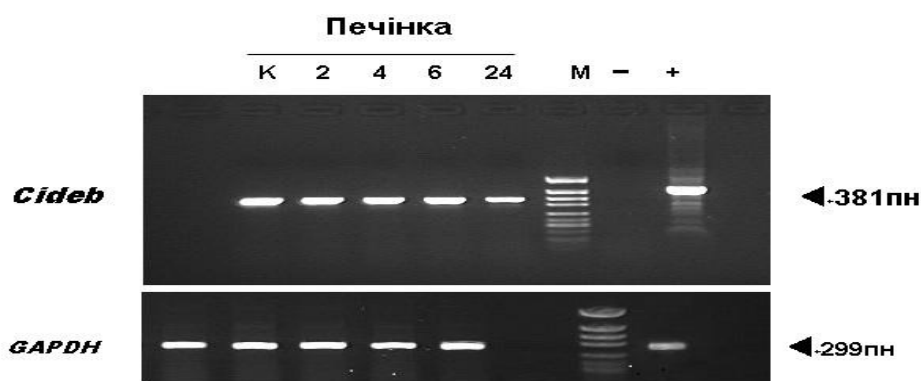


**Рис. 3.31. Експресія гена *Cideb* у різних тканинах мишей за гіпертермії.** Тканини отримували на 2, 4, 6 та 24 год після теплового шоку. Праворуч представлена електрофореграма фрагментів маркера молекулярної маси М, а цифрами позначено розміри деяких із них у парах нуклеотидних залишків (п.н.). (-) – негативний контроль, реакційна суміш без додавання кДНК.

Наші результати підтверджуються даними інших дослідників, які виявили високий рівень експресії *Cideb* у печінці та нирках [475], що

зумовлено характерним для цих тканин високим рівнем метаболізму жирних кислот.

Порівняннями тканинно-специфічної особливості експресії гена *Cideb* за гіпертермії встановлено, що у тканинах з високим рівнем експресії гену спостерігається його зниження, тоді як у органах з незначною експресією чи її відсутністю після теплового впливу, навпаки, відзначається підвищення експресії гену *Cideb*. Так, у тканинах кишечника, нирок та печінки виявлено зниження експресії гена *Cideb*, відповідно, на 2, 6 та 24 год після впливу на тварин теплового шоку, тоді як у досліджуваних зразках, отриманих з прямої кишки мишей дослідних груп рівень експресії досліджуваного гену підвищувався на 6-ту год спостереження.

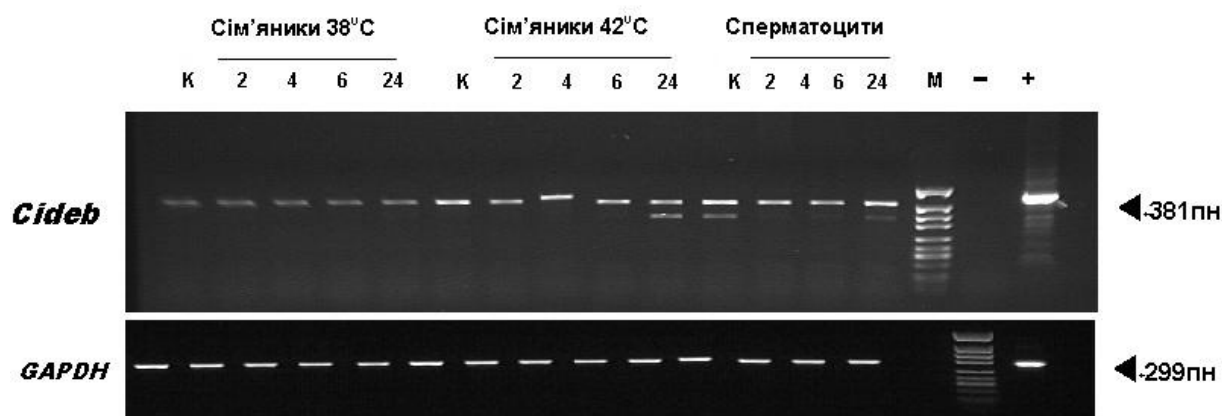


**Рис. 3.32.** Аналіз гена *Cideb* у печінці мишей за гіпертермії. Тканини отримували на 2, 4, 6 та 24 год після теплового шоку.

Посилюючий ефект гіпертермії на рівень експресії гена *Cideb* у шлунку виявлявся лише на 2 год, тоді як на 6 год спостерігали незначну зміну експресії цього гену.

Для виявлення впливу гіпертермії на активність гена *Cideb* проведено аналіз рівня експресії цього гена у репродуктивних органах (сім'яниках і сперматоцитах) та печінці після одноразової дії теплового шоку за температури 38°C та 42°C. На рис. 3.33 показано, що у сім'яниках мишей за

гіпертермії при температурі 38°C активність гена *Cideb* не змінюється, тоді як за підвищення температури до 42°C експресія гена посилюється як у сім'яниках, так і в сперматоцитах.



**Рис. 3.33.** Аналіз *Cideb* у сім'яниках і сперматоцитах миші за гіпертермії. Тканини отримували на 2, 4, 6 та 24 год після теплового шоку.

Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР гену *Cideb* з сім'яників показав наявність ще однієї смужки, що може вказувати про наявність альтернативного сплайс-варіанту мРНК *Cideb* у сім'яниках миші.

Встановлено, що тільки у сперматоцитах контрольних та дослідних мишей, окрім основного фрагменту ДНК розміром 381 пн., який відповідає нативній формі гену *Cideb*, синтезується додатковий фрагмент меншої величини, що ймовірно, відповідають альтернативному сплайс-варіантам *Cideb*. З'ясування спектру можливих сплайс-варіантів *Cideb*, природи їх експресії у сперматоцитах миші потребує подальших додаткових досліджень з підбором інших праймерів.

Результати досліджень вказують на можливість індукції за гіпертермії нового варіанту *Cideb* у сперматоцитах миші, що може мати важливе значення для розуміння механізмів регуляції сперматогенезу за впливу

чинників, які можуть призвести до зниження фертильності [510, 527, 546]. Тому результати досліджень показали, що гіпертермія виражено змінює рівень експресії гена *Cideb*, однак її інтенсивність залежить від типу тканини, а також ступеня та тривалості теплового шоку.

Отже, вивчення рівня експресії *Cideb* за гіпертермії на організм самців-миші в умовах *in vivo*, встановило, що характер змін експресії гена *Cideb* значною мірою залежить від типу тканин, що обумовлено різною їх здатністю адаптуватися до дії стресу. Встановлено, що ген *Cideb* експресується як у печінці, так і в шлунку, кишківнику, нирках та товстому кишківнику і його експресія суттєво змінюється за ТШ. Характер експресії гена за ТШ відрізняється у цих органах. Так, гіпертермія посилює експресію у печінці, кишківнику та нирках і знижується у шлунку та яєчках мишей. Виявлений тканинно-специфічний характер експресії *Cideb* за гіпертермії, узгоджується з даними літератури [428] щодо конститутивно високого рівня експресії гена у більшості лімфоїдних органів, печінці, а також у кістковому мозку.

Водночас у дослідженнях *in vivo* встановлено, що у тканинах сім'яників та сперматоцитах миші експресія *Cideb* суттєво не змінюється порівняно з іншими досліджуваними тканинами. Виявлено, що характер експресії *Cideb* у цих тканинах залежить від ступеню гіпертермії. Так, за температури 38°C експресія гена у контрольних та дослідних тканинах не змінюється, тоді як при 42°C спостерігається підвищення експресії гена *Cideb* у сім'яниках на 2, 6 та 24 год від початку теплового шоку.

Поява альтернативного сплайсинг-варіанту *Cideb* не виявлена в інших досліджуваних тканинах, а індукується за впливу теплового шоку лише у сім'яниках контрольних та дослідних тварин, причому інтенсивність індукції посилюється за збільшення температури. Ймовірно, що за гіпертермії індукція експресії додаткового сплайсинг-варіанту *Cideb* у сім'яниках мишей є адаптаційною реакцією на шкідливу дію теплового шоку.

Результати досліджень даного розділу опубліковані у [255, 256, 258, 457, 514, 515].

### **3.5. Біотехнологічні підходи до стимуляції відтворювальної здатності самок кролиць за участі біогенних мікроелементів**

Успішність відтворення визначається отриманим здоровим потомством і вимагає створення оптимальних умов для нормального функціонування організму в прегравідарний, гестаційний та період вагітності. Мікроелементний гомеостаз організму визначає успішність репродуктивної здатності: запліднення, імплантації та фізіологічного перебігу вагітності. Відхилення у вмісті мікроелементів за підвищеного надходження абіотичних елементів та дефіциті біогенних елементів призводить до значних порушень здоров'я. Оптимальний вміст і співвідношення біогенних металів в організмі зумовлює нормальний перебіг обмінних процесів, які сприяють змінам функціональної активності органів і систем, що позитивно впливає на фертильність та відтворення. Актуальність роботи зумовлена необхідністю забезпечення мікронутрієнтами організму на прегравідарному етапі та у період гестації, а також їх використання як корегуючих метаболізм факторів за екологічно обумовленій дисфункції репродуктивної функції. Для ефективного застосування мінерального комплексу необхідним є розуміння механізмів впливу кожного елементу, їх взаємозв'язку на різних ланках метаболічних процесів.

**3.5.1. Встановлення оптимальної концентрації органічних сполук Мангану, Цинку та Хрому на клітинах лінії NIN3T3 та клітинах яйцепроводів та ендометрію кролиць.** Завданням цього дослідження було експериментально з'ясувати цитотоксичну активність та встановити

оптимальну концентрацію глутамату мангану та цинку, хром-метіоніну стосовно ембріональних фібробластів лінії NIH3T3.

Результати досліджень впливу різних концентрацій та сполук мангану на активність проліферації клітин лінії NIH3T3 показали, що за дії органічної сполуки глутамату мангану, на відміну від використання сульфату мангану зростає інтенсивність проліферативного росту культури впродовж 72-годинного культивування (табл. 3.42).

Таблиця 3.42.

**Проліферативна активність та життєздатність культури клітин лінії  
NIH3T3 впродовж 72 год культивування, n=3; M±m**

Група	Термін культиву- вання, год	Загальна кількість клітин, млн/см <sup>3</sup>	% життєз- датності	% цитоток- сичності	Індекс проліфера- ції клітин
Контроль	24	1,54±0,10	92,87	1,13	1,9
	48	1,73±0,40	100	—	2,2
	72	2,23±0,35	98,88	1,12	2,8
Д <sub>1</sub> (Mn глутамат, 08 мкг/мл)	24	1,56±0,41	92,87	7,13	2,0
	48	2,23±0,30	100	—	2,8
	72	2,73±0,07	97,71	2,29	3,4
Д <sub>2</sub> (Mn глутамат, 0,16 мкг/мл)	24	1,45±0,08	97,49	2,51	1,9
	48	2,22±0,13	99,46	0,54	2,8
	72	2,43±0,12	97,09	2,9	3,0
Д <sub>3</sub> (Mn глутамат, 0,32 мкг/мл)	24	1,34±0,09	93,48	6,52	1,7
	48	1,2±0,30	94,79	5,21	1,5
	72	1,70±0,12	87,04	12,96	2,1
Д <sub>4</sub> (MnSO <sub>4</sub> 0,1 мкг/мл)	24	1,07±0,08*	92,41	7,59	1,3
	48	0,92±0,07	56,37	43,63	1,2
	72	0,69±0,05*	67,30	32,70	0,9

На 24-ту год культивування концентрація клітин контрольної, 1-ої та 2-ої дослідних груп знаходилась на одному рівні, тоді як в 3-ій дослідній групі при додаванні глютамату мангану у вищій концентрації – 0,32 мкг/мл та 4-ій дослідній групі ( $\text{MnSO}_4$ ) спостерігали зниження росту клітин.

Аналогічна тенденція росту культури спостерігалась і на 48-му год культивування. При внесенні до клітин лінії NIH3T3 глютамату мангану у низьких дозах — 0,08 та 0,16 мкг/мл інтенсивність росту клітин 1-ої та 2-ої дослідних груп на 48-му год культивування підвищується у 1,29 раза у порівнянні до контролю, проте у 3-ій та 4-ій дослідних групах спостерігали зниження проліферативної активності культури клітин фібробласту в 0,69 та 0,53 раза. На 48-му год культивування після додавання глютамату мангану в дозах 0,32 мкг/мл у 3-ій дослідній групі спостерігали незначне зниження проліферації клітин порівняно з 24-ою год культивування. Можна припустити, що це зниження зумовлено адаптацією ембріональних фібробластів до впливу глютамату мангану, оскільки на 72-гу год культивування відмічено підвищення проліферативної активності культури.

На 72-гу год культивування в 1-й та 2-й дослідних групах при внесенні до ембріональних фібробластів глютамату мангану у нижчих дозах 0,08 та 0,16 мкг/мл спостерігали вірогідне зростання концентрації клітин ( $p < 0,001$ ), що у 1,22 та 1,09 разу перевищувало відповідний показник контрольної групи. Тоді як 4-й дослідній групі при введенні до культурального середовища неорганічної сполуки манган (II) сульфату спостерігається тенденція до поступового зниження проліферації клітин упродовж 72-ох год культивування, як в порівнянні з контрольною групою, так і в межах даної групи.

Проведені дослідження виявили, що внесення глютамату мангану в концентраціях 0,08, 0,16 та 0,32 мкг/мл до ембріональних фібробластів супроводжувалося зростанням проліферативного росту культури у порівнянні з додаванням неорганічної форми – сульфату мангану. Крім того, найнижча з досліджуваних концентрацій глютамату мангану 0,08 мкг/мл



викликає найбільше підвищення проліферативного росту ембріональних фібробластів впродовж 72-ох год культивування, ніж вищі концентрації сполуки мангану.

Аналізуючи дані щодо впливу досліджуваних сполук мангану на життєздатність клітин, слід відзначити залежність між концентрацією глютамату мангану та життєздатністю клітин. Зокрема, відсоток життєздатних клітин контрольної та 1-ої дослідної груп упродовж культивування зберігається на одному рівні, тоді як у 2-ій дослідній групі відмічено зниження життєздатності клітин з 97,49 % на 48-гу год культивування до 97,09 % на 72-гу год. Зниження відсотку життєздатних клітин впродовж тривалого культивування спостерігалось у 3-ій та 4-ій дослідних групах.

Індекс проліферації клітин на 24-ту год культивування був найвищим у 1-ій дослідній групі та контролі. Через 48 год культивування спостерігали підвищення індексу проліферації у 1-ій, 2-ій дослідних та контрольній групах, тоді як в 3-ій та 4-ій дослідних групах на 48 год культивування відмічено зниження проліферативної здатності клітин. Аналогічна тенденція зберігалася при визначенні індексу проліферації і на 72-гу год культивування.

Для підтвердження функціональної активності ембріональних фібробластів у процесі їх культивування проводили біохімічні дослідження середовища через кожні 24 год (табл. 3.43).

Підвищення проліферативної активності клітин за умов додавання до культурального середовища органічних сполук мангану підтверджується посиленням обмінних процесів у культурі клітин. Аналіз біохімічних показників кондиційного середовища за додавання глютамату мангану виявив зниження рівня активності ЛДГ в усіх групах упродовж культивування. У контролі ЛДГ активність у середовищі культивування ембріональних фібробластів на 24-ту год була найвищою порівняно з дослідними групами.

Таблиця 3.43.

**Активність лактатдегідрогенази у кондиційному середовищі після 72-ох год культивування клітин лінії NIH3T3, n=3; M±m**

Група	ЛДГ, МО		
	Термін культивування, год		
	24	48	72
Контроль	54,6±1,56	47,2±0,40	42,3±0,72
Д <sub>1</sub> (Mn глутамат, 0,08 мкг/мл)	46,4±0,99*	41,3±1,02**	18,2±0,69***
Д <sub>2</sub> (Mn глутамат, 0,16мкг/мл)	44,0±0,45**	38,5±0,76***	31,6±0,85**
Д <sub>3</sub> (Mn глутамат, 0,32 мкг/мл)	50,4±0,72	41,8±0,91**	43,8±0,91
Д <sub>4</sub> (MnSO <sub>4</sub> , 0,1 мкг/мл)	54,6±0,60	41,4±0,67**	44,2±0,92

На 48-72 год культивування активність ЛДГ у контрольній та всіх дослідних групах знижувався відносно її рівня на 24-ту год культивування, що пов'язано зі зростанням проліферативної активності клітин та їх високою життєздатністю.

При дослідженні метаболічної активності ембріональних фібробластів найвища активність відмічена в 1-ій та 3-ій дослідних групах на 24-ту год культивування, за культивування клітин за умов додавання до середовища глутамату Mn у дозі 0,8 та 0,32 мкг/мл відповідно (табл. 3.44).

Найнижча метаболічна активність клітин лінії NIH3T3 на 1-шу добу була в 4-ій дослідній групі і ця тенденція зберігалась впродовж усього періоду культивування. Життєздатність клітин в 1-ій дослідній групі впродовж усього періоду культивування була вищою порівняно з показниками інших дослідних груп. Метаболічна активність клітин 2-ої дослідної групи на 48-72 год культивування також зростає і складає 144-79,63 %.

Таблиця 3.44.

**Життєздатність клітин лінії NIH3T3 впродовж 72-ох год культивування  
за МТТ-тестом, n=3; M±m**

Група	МТТ, % від контролю		
	Термін культивування, год		
	24	48	72
Контроль	100	100	100
Д <sub>1</sub> (Mn глутамат, 0,08 мкг/мл)	125,13±11,75	183,13±27,26 <sup>a</sup>	84,83±6,89
Д <sub>2</sub> (Mn глутамат, 0,16 мкг/мл)	100,77±1,35	144,0±10,96 <sup>b</sup>	79,63±7,53
Д <sub>3</sub> (Mn глутамат, 0,32 мкг/мл)	124,37±10,49	133,27±13,81 <sup>c</sup>	71,93±6,98
Д <sub>4</sub> (MnSO <sub>4</sub> , 0,1 мкг/мл)	84,23±6,39	49,40±14,24 <sup>d*</sup>	67,97±9,07

Примітка: d:a; d:b – P<0,05.

Це вказує на позитивний впливу глутамату мангану у досліджуваних концентраціях на проліферативну активність ембріональних фібробластів лінії NIH3T3.

Порівнюючи дані проліферативної активності клітин лінії LL2 за дії сполук мангану можна стверджувати, що суттєве підвищення клітинного росту культури впродовж 72-ох год культивування спостерігали в 1-ій дослідній групі, клітини якої культивували за введення найменшої з досліджуваних концентрацій глутамату мангану - 0,08 мкг/мл (табл. 3.45). Тоді як у 2-ій дослідній групі за використання концентрації глутамату Mn 0,16 мкг/мл, концентрація клітин впродовж культивування була майже на одному рівні. Найвища доза глутамату мангану - 0,32 мкг/мл та застосування MnSO<sub>4</sub> знижували проліферативну активність клітин впродовж культивування.

Відсоток життєздатних клітин на 24-ту год культивування в контрольній, 2-ій та 3-ій дослідних групах був найвищим і незначно зростав упродовж культивування. Тоді як у 1-ї та 4-ї дослідних групах відмічено

зростання життєздатності клітин з 88,3 та 71,85 % на 24-ту год культивування до 95,69 та 90,28 % на 72-гу год культивування відповідно.

Таблиця 3.45.

**Проліферативна активність та життєздатність клітин лінії LL2  
впродовж культивування,  $M \pm m$ ;  $n=3$**

Група	Культивування, год	Кількість клітин, млн/мл	% життєздатності	% цитотоксичності	Індекс проліферації клітин
Контроль	24	1,29 $\pm$ 0,20	95,82	4,18	1,62
	48	1,35 $\pm$ 0,04	97,53	2,47	1,69
	72	1,74 $\pm$ 0,06	98,33	1,67	2,17
Д <sub>1</sub> (Mn глутамат, 0,08 мкг/мл)	24	1,77 $\pm$ 0,20	88,03	11,97	2,22
	48	1,55 $\pm$ 0,20	90,32	9,68	1,94
	72	2,03 $\pm$ 0,20	95,69	4,31	2,54
Д <sub>2</sub> (Mn глутамат, 0,16 мкг/мл)	24	1,44 $\pm$ 0,20	93,62	6,38	1,79
	48	1,44 $\pm$ 0,20	93,64	6,36	1,8
	72	1,54 $\pm$ 0,20	95,42	4,58	1,93
Д <sub>3</sub> (Mn глутамат, 0,32 мкг/мл)	24	1,95 $\pm$ 0,09	94,24	5,76	2,44
	48	1,35 $\pm$ 0,09	96,30	3,7	1,69
	72	1,46 $\pm$ 0,05*	94,02	5,98	1,83
Д <sub>4</sub> (MnSO <sub>4</sub> 0,1 мкг/мл)	24	2,17 $\pm$ 0,10*	71,85	28,15	2,71
	48	1,25 $\pm$ 0,03	96,39	3,61	1,56
	72	1,5 $\pm$ 0,15	90,28	9,72	1,88

Індекс проліферації клітин контрольної, 1-ої та 2-ої дослідних груп упродовж 72-ох год культивування зростає, тоді як в 3-ій та 4-ій дослідних групах відзначена протилежна тенденція. Виявлені зміни пов'язані з інтенсивним ростом клітин контрольної та дослідних груп після 72-гу год

культивування. Зміну метаболічного стану клітин оцінювали за активністю в кондиційному середовищі цитозольного ензиму ЛДГ, який відображає інгібування інтенсивності клітинного дихання (табл. 3.46).

Таблиця 3.46.

**Активність лактатдегідрогенази у кондиційному середовищі  
впродовж 72-ох год культивування клітин лінії LL2,  $M \pm m$ ;  $n=3$**

Група	ЛДГ, МО		
	Термін культивування, год		
	24	48	72
Контроль	42,9 $\pm$ 1,56	49,5 $\pm$ 0,40	42,5 $\pm$ 0,72
Д <sub>1</sub> (Mn глутамат, 0,08 мкг/мл)	45,3 $\pm$ 0,99	49,4 $\pm$ 1,02	41,9 $\pm$ 0,69
Д <sub>2</sub> (Mn глутамат, 0,16 мкг/мл)	47,9 $\pm$ 0,45**	49,5 $\pm$ 0,76	42,1 $\pm$ 0,85
Д <sub>3</sub> (Mn глутамат, 0,32 мкг/мл)	44,7 $\pm$ 0,72	44,8 $\pm$ 0,91**	39,1 $\pm$ 0,15**
Д <sub>4</sub> (MnSO <sub>4</sub> , 0,1 мкг/мл)	51,3 $\pm$ 0,60**	43,9 $\pm$ 0,67**	36,2 $\pm$ 0,92**

У контрольній, 1-ій та 2-ій дослідних групах на 48-му год культивування відзначено зростання рівня ЛДГ, тоді як активність ЛДГ на 72-гу год культивування у цих групах знижується відносно її концентрації на 24 та 48 год, проте впродовж всього періоду культивування залишається на високому рівні. У 4-ій дослідній групі на 24-ту год відмічено високий рівень активності ЛДГ у середовищі культивування клітин лінії LL2, однак на 48 та 72 год культивування у цій дослідній групі вірогідно знижувалась активність ЛДГ ( $p<0,01$ ;  $p<0,01$ ).

Проведені дослідження показали, що у всіх досліджуваних групах на 24-ту год культивування спостерігалась висока метаболічна активність клітин. Найвищу життєздатність культури клітин упродовж усього періоду культивування відзначено у 1-ій дослідній групі (табл. 3.47).

Таблиця 3.47.

**Життєздатність клітин лінії LL2 впродовж 72-годинного культивування  
за МТТ-тестом, n=3; M±m**

Група	МТТ, % від контролю		
	Термін культивування, год		
	24	48	72
Контроль	100	100	100
Д <sub>1</sub> (Mn глутамат, 0,08 мкг/мл)	127,12±8,13	102,22±3,2	119,83±9,67
Д <sub>2</sub> (Mn глутамат, 0,16 мкг/мл)	116,26±10,81	95,90±9,6	89,00±11,48
Д <sub>3</sub> (Mn глутамат, 0,32 мкг/мл)	122,39±13,54	91,34±7,45	82,70±6,35
Д <sub>4</sub> (MnSO <sub>4</sub> , 0,1 мкг/мл)	126,61±9,87	88,52±3,33	77,91±13,38

Отже, сполуки мангану у різних досліджуваних концентраціях підвищують інтенсивність обмінних процесів досліджуваних культур клітин, що проявляється підвищенням концентрації клітин, високим рівнем життєздатності культури та зниженням вмісту ЛДГ у кондиційному середовищі впродовж 72-ох год культивування.

При дослідженні впливу глутамату цинку на ембріональні фібробласти лінії NIH3T3 впродовж 24-ох год культивування встановлено, що додавання до культурального середовища нижчих концентрацій цинку глутамату 0,1 мкг/мл та 0,15 мкг/мл сприяло підвищенню росту клітин у 1-ій та 2-ій дослідних групах порівняно з контролем (табл. 3.48).

Проліферативна активність клітин у контролі та 2-ій дослідній групі на 48-му год культивування була приблизно на одному рівні, тоді як 72-гу год культивування концентрація клітин у цій дослідній групі була вірогідно вищою. Вища доза глутамату цинку 0,25 мкг/мл та сульфату цинку 0,1 мкг/мл викликали більш значне зниження росту фібробластів упродовж 72-ох год культивування. Так, концентрація клітин у 4-ій дослідній групі через 24

та 48 год культивування була в 1,1 раза нижчою, а на 72 год в 1,9 раза нижчою, ніж у контрольній групі.

Таблиця 3.48.

**Проліферативна активність та життєздатність клітин лінії NIN3T3**

**впродовж 72 год культивування, n=3; M±m**

Група	Термін культи- вування, год	Загальна кількість клітин, млн/мл	% життєз- датності	% цитоток- сичності	Індекс проліферац ії клітин
Контроль	24	1,34±0,12	97,0	3	1,7
	48	1,75±0,09	100	—	2,2
	72	2,59±0,05	90,7	9,3	3,2
Д <sub>1</sub> (Zn глутамат, 0,1 мкг/мл)	24	1,51±0,07	96,9	3,1	1,9
	48	1,85±0,05*	100	—	2,3
	72	2,73±0,15**	92,7	7,3	3,4
Д <sub>2</sub> (Zn глутамат, 0,15 мкг/мл)	24	1,59±0,02	96,1	3,9	2,0
	48	1,79±0,08	96,3	3,7	2,2
	72	2,97±0,09***	91,3	8,7	3,7
Д <sub>3</sub> (Zn глутамат, 0,25 мкг/мл)	24	1,43±0,10	82,8	17,2	1,8
	48	1,57±0,10	74,8	25,2	1,9
	72	1,64±0,08	88,3	11,7	2,1
Д <sub>4</sub> (ZnSO <sub>4</sub> 0,1 мкг/мл)	24	1,23±0,06	86,1	13,9	1,5
	48	1,53±0,09	78,9	21,1	1,9
	72	1,33±0,06	96,2	3,8	1,7

Індекс проліферації клітин на 24-ту год культивування був найнижчим у 4-ій дослідній групі та контролі, відповідно 1,5 та 1,7 та дещо вищим у 3-ій дослідній групі, при додаванні глутамату цинку до культурального

середовища у високій дозі – 0,25 мкг/мл. Через 48 год культивування спостерігалось підвищення індексу проліферації у всіх дослідних та контрольній групах, тоді як на 72 год культивування тільки в 4-ій дослідній групі відмічено зниження індексу проліферації клітин.

Життєздатність клітин контрольної, 1-ої та 2-ої дослідних груп упродовж культивування була високою і становила 92,7-100 %. Тоді як відсоток життєздатних клітин 3-ої та 4-ої дослідних груп упродовж культивування знижувався стосовно інших дослідних груп, проте загалом залишався на досить високому рівні на 3-тю добу культивування.

З метою вивчення інтенсивності обмінних процесів у ембріональних фібробластах лінії NIH3T3 за дії різних доз сполук цинку, проводили дослідження активності ЛДГ (табл. 3.49). У всіх дослідних та контрольній групах спостерігається тенденція до зниження рівня активності ЛДГ у кондиційному середовищі впродовж культивування.

Таблиця 3.49.

**Активність ЛДГ у кондиційному середовищі впродовж 72 год культивування клітин лінії NIH3T3 за додавання різних доз глютаму цинку, n=3; M±m**

Група	ЛДГ, МО		
	Термін культивування, год		
	24	48	72
Контроль	54,4±0,1	41,9±0,3	12,5±0,4
Д <sub>1</sub> (Zn глютаму, 0,1 мкг/мл)	50,2±0,1	37,6±0,2*	8,6±0,3*
Д <sub>2</sub> (Zn глютаму, 0,15 мкг/мл)	46,0±0,1*	33,5±0,1**	10,9±0,3
Д <sub>3</sub> (Zn глютаму, 0,25 мкг/мл)	54,4±0,2	37,6±0,1*	29,3±0,3**
Д <sub>4</sub> (ZnSO <sub>4</sub> , 0,1 мкг/мл)	51,5±0,2	41,9±0,2	25,1±0,3**



Проте, у 1-й та 2-й дослідних групах на 72 год культивування активність екстраклітинної ЛДГ ( $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ) знижувалась відносно показника контрольної групи, що пов'язано зі зростанням проліферативної активності клітин у цих групах та їх високою життєздатністю. Водночас у 3-й та 4-й дослідних групах на 72 год культивування активність ЛДГ ( $p<0,001$ ) зростала порівняно до контрольної групи.

Найвища метаболічна активність впродовж 24-72 год культивування була в 1-й та 2-й дослідних групах, клітини яких культивували при додаванні глютаму цинку в нижчих дозах – 0,1 та 0,15 мкг/мл (таблиці 3.50). Життєздатність клітин 3-ої та 4-ої дослідних груп упродовж усього періоду культивування складала — 83,9-93,5 %, що вказує на відсутність негативного впливу сполук цинку у досліджуваних концентраціях.

Таблиця 3.50.

**Життєздатність клітин лінії NIH3T3 упродовж культивування за МТТ-тестом,  $n=3$ ;  $M \pm m$**

Група	МТТ, % від контролю		
	Термін культивування, год		
	24	48	72
Контроль	100	100	100
Д <sub>1</sub> (Zn глютаму, 0,1 мкг/мл)	97,96 $\pm$ 2,23	99,62 $\pm$ 2,67 <sup>a</sup>	90,78 $\pm$ 10,45
Д <sub>2</sub> (Zn глютаму, 0,15 мкг/мл)	94,16 $\pm$ 2,59	95,59 $\pm$ 2,96 <sup>b</sup>	89,79 $\pm$ 3,74
Д <sub>3</sub> (Zn глютаму, 0,25 мкг/мл)	83,32 $\pm$ 1,51	71,77 $\pm$ 5,59 <sup>c</sup>	85,38 $\pm$ 0,62
Д <sub>4</sub> (ZnSO <sub>4</sub> , 0,1 мкг/мл)	87,71 $\pm$ 4,70	74,63 $\pm$ 7,36 <sup>d</sup>	92,35 $\pm$ 1,62

Примітка: с:а; d:c –  $P<0,05$ .

Отже, введення до культурального середовища глютаму цинку в низьких дозах 0,1 мкг/мл та 0,15 мкг/мл забезпечує інтенсивний ріст ембріональних фібробластів та функціональну активність клітин, що

підтверджується результатами біохімічних досліджень. Найбільш виражене зниження проліферативної активності клітин лінії NIH3T3 впродовж 72 год культивування спостерігали за додавання глутамату цинку в дозі 0,25 мкг/мл та сульфату цинку в концентрації 0,1 мкг/мл.

У результаті досліджень на ембріональних фібробластах встановлено, що оптимальною дозою, яка позитивно впливає на проліферацію клітин є доза хром-метіоніну 0,03 мкг/мл середовища (табл. 3.51). На 48 годину культивування концентрація клітин вірогідно зростала відповідно до показника контрольної групи. Вищі дози хром-метіоніну викликали вірогідне зниження проліферативного росту клітин на 48 та 72 год культивування.

*Таблиця 3.51.*

**Культивування ембріональних фібробластів за додавання хром-метіоніну до культурального середовища, n=3; M±m**

Група	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл, на год		
	24	48	72
Контроль	3,36±0,08	6,36±0,07	7,61±0,03
Д <sub>1</sub> (хром-метіонін 0,03 мкг/мл)	3,41±0,02	6,95±0,09**	8,48±0,2**
Д <sub>2</sub> (хром-метіонін 0,05 мкг/мл)	2,31±0,02**	3,22±0,03***	5,31±0,02***
Д <sub>3</sub> (хром-метіонін 0,25 мкг/мл)	2,08±0,07**	4,06±0,06***	4,55±0,05***

Аналогічні результати були отримані при тестуванні хром-метіоніну на клітинах ендометрію. Додавання до культурального середовища хром-метіоніну в дозі 0,03 мкг/мл викликало збільшення кількості клітин ендометрію корів впродовж всього періоду культивування, у порівнянні до показника контрольної групи (табл. 3.52).

Таблиця 3.52.

**Культитивування клітин ендометрію корів за додавання хром-метіоніну до культурального середовища, n=3; M±m**

Група	Концентрація клітин $\times 10^6$ /мл, на год		
	24	48	72
Контроль	2,86±0,05	4,16±0,08	5,38±0,06
Д <sub>1</sub> .(хром-метіонін 0,03 мкг/мл)	3,08±0,04*	4,55±0,10*	6,73±0,80
Д <sub>2</sub> .(хром-метіонін 0,05 мкг/мл)	2,27±0,06**	3,52±0,03**	4,30±0,03***
Д <sub>3</sub> .(хром-метіонін 0,25 мкг/мл)	2,12±0,08**	3,21±0,06***	3,75±0,05***

Введення хром-метіоніну у вищих концентраціях до культури клітин ендометрію корів вірогідно знижувало кількість клітин у 2-ій ( $p < 0,001$ ) та 3-ій ( $p < 0,001$ ) дослідних групах на 24-ту год культивування відносно показників контрольної групи. Тенденція щодо зниження проліферативної активності клітин ендометрію зберігається впродовж усього періоду культивування.

Отже, встановлено, що глутамат мангану та цинку у досліджуваних концентраціях не викликають цитотоксичного впливу на клітини лінії NIN3T3 та LL2 впродовж культивування. За низьких концентрацій глутамату мангану (0,08 і 0,16 мкг/мл) та глутамату цинку (0,1 і 0,15 мкг/мл) спостерігається висока життєздатність клітин та зростання індексу проліферації клітин, що вказує на функціональну активність клітин.

Вищі дози глутамату мангану 0,32 мкг/мл та глутамату цинку 0,25 мкг/мл зумовлюють незначне інгібування проліферативної активності клітин, зберігаючи при цьому функціональну активність ембріонального фібробласту та клітин лінії LL2, що підтверджується зниженням активності

ЛДГ у кондиційному середовищі. Внесення до культурального середовища сульфату мангану та цинку в концентрації  $0,1 \text{ мкг/см}^3$  зумовило зниження проліферації клітин у дослідних групах у порівнянні з контрольною впродовж 72-ох год культивування.

За оцінювання впливу хром-метіоніну на ембріональних фібробластах та ендометрію корів спостерігався дозозалежний вплив. Додавання  $0,03 \text{ мкг/мл}$  хром-метіоніну викликає підвищення проліферації клітин ендометрію, тоді як вищі концентрації гальмують ріст клітин.

Проведені *in vitro* дослідження забезпечили тестування органічних форм мангану, цинку та хрому, встановлення цитотоксичного впливу та визначення їх оптимальної концентрації на стандартизованих лініях клітин та культурах клітин репродуктивних органів, що дозволило в подальшому проводити дослідження на лабораторних тваринах.

**3.5.2. Вплив хром-метіоніну на запліднення та ранній ембріональний розвиток у кролів.** Метою досліджень було з'ясування впливу хелатної сполуки хрому (хром-метіонін) на репродуктивну функцію самиць, стимуляцію формування ембріонально-маткових взаємодій та біохімічні показники антиоксидантного захисту і перокисного окиснення ліпідів у тканинах кролиць.

Одержані результати морфометричної оцінки репродуктивних органів показали, що за умов згодовування кролицям 1-ої дослідної групи хром-метіоніну в дозі  $25 \text{ мкг/гол/добу}$ , виявлено підвищення маси яєчників, яйцепроводів та матки у 1,3-1,5 раза щодо відповідних показників контрольної групи (табл. 3.53).

Згодовування хром-метіоніну позитивно впливає на репродуктивну здатність самиць, прояв статевої охоти, запліднення, ріст і розвиток ембріонів та їх імплантацію, оскільки після забою на 14-ту добу сукрільності у цій дослідній групі виявлена максимальна кількість плодів у порівнянні з контролем та найнижча ембріональна смертність –  $4,3 \%$ .

Таблиця 3.53.

**Морфометричні показники та рівень приживлення ембріонів у кролиць за згодовування хром-метіоніну до запліднення,  $M \pm m$ ;  $n=4$**

Група Показник	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
Кількість жовтих тіл на 1 самку	12,5 $\pm$ 0,5	11,75 $\pm$ 0,75	10,5 $\pm$ 1,0
Кількість місць імплантації на 1 самку	10,5 $\pm$ 0,5	11,25 $\pm$ 0,75	9,5 $\pm$ 2,5
Кількість живих ембріонів на 1 самку	10,5 $\pm$ 0,5	11,25 $\pm$ 0,75	8,5 $\pm$ 3,5
Кількість резорбцій на 1 самку	–	–	2
Доімплантаційна загибель, %	16	4,3	0
Постімплантаційна загибель, %	0	0	19,05
Загальна ембріональна смертність, %	16	4,3	19,05

Додавання до раціону самок хром-метіоніну в дозі 50 мкг/гол/добу упродовж 6 тижнів перед осіменінням зумовлює менш виражений вплив на їх репродуктивну здатність, що проявляється зменшенням кількості зон імплантації плодів порівняно з 1-ою дослідною та контрольною групами.

Під час вагітності проходять значні зміни у системі кровотворення. Вже на початку вагітності збільшується загальний об'єм крові для забезпечення підвищеної потреби матері і плоду, підтриманні оптимальних умов мікроциркуляції в плаценті і органах самки (серце, мозок, печінка, нирки) на тлі збільшення циркулюючої плазми.

Проведені гематологічні дослідження крові кролиць 1-ої дослідної групи, яким згодовували хром-метіонін вказують на збільшення вмісту гемоглобіну на 9,45 %, кількості еритроцитів на 10 % та лейкоцитів – на

1,4 % відповідно до контрольної групи, тоді як гематологічні показники у контрольній та 2-ій дослідній групі були на одному рівні (табл. 3.54).

*Таблиця 3.54.*

**Гематологічні показники кролиць за згодовування хром-метіоніну,  $M \pm m$ ;  
n=4**

Показник	Група		
	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
Лейкоцити, $10^9$ /л	$7,2 \pm 0,30$	$7,3 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,1$
Еритроцити, $10^{12}$ /л	$4,2 \pm 0,46$	$4,6 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,61$
Гемоглобін, г/%	$14,8 \pm 0,68$	$16,2 \pm 0,3$	$14,7 \pm 0,55$

Ці дані вказують на стимулювальний вплив хром-метіоніну на процеси еритропоезу та киснево-транспортну функцію крові, адже відомо, що еритроцити завдяки гемоглобіну беруть участь у перенесенні Оксигену. Тоді як збільшення кількості лейкоцитів, ймовірно, зумовлене так званим фізіологічним лейкоцитозом, який спостерігається при вагітності і викликаний напруженням адаптивних механізмів в організмі самиць.

Отже, виявлені зміни вказують на те, що згодовування хром-метіоніну в дозі 25 мкг/гол/добу у формі ліпосомального препарату стимулює процеси еритропоезу і підвищує синтез гемоглобіну в організмі кролиць за сукрільності.

За фізіологічного перебігу вагітності в організмі відбуваються морфологічні і фізіологічні зміни, спрямовані на збереження і розвиток плода. З настанням вагітності посилюється діяльність залоз внутрішньої секреції, особливо гіпофізу та яєчників, відбувається динамічна зміна концентрації статевих стероїдів, що супроводжується підвищенням рівня прогестерону.

Зміна гормонального фону, яка характерна при вагітності, особливо в період імплантації та ранні терміни сукрільності, призводить до

перерозподілу протеїнових фракцій, що пов'язане зі збільшення вмісту багатьох специфічних протеїнів-переносників. Отримані результати показали, що введення хром-метіоніну зумовило підвищення вмісту загального протеїну в сироватці крові 2-ої дослідної групи у порівнянні з контрольною на 8,35 % (табл. 3.55).

Таблиця 3.55.

**Вміст загального протеїну та його фракцій у сироватці крові кролиць за згодовування хром-метіоніну, n=4; M±m**

Показник	Група		
	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
Загальний протеїн, г/л	64,05±0,47	65,3±0,86	69,4±0,54
Протеїнові фракції, %			
Альбуміни, %	49,32±0,64	53,37±0,97*	58,6±1,49**
α-глобуліни, %	16,56±0,83	15,41±1,21	12,33±0,65**
β-глобуліни, %	9,85±0,37	10,46±0,32	9,39±0,36
γ-глобуліни, %	24,27±1,11	20,76±0,95	19,68±0,93*

Тенденція до зростання у сироватці крові вмісту загального протеїну є ознакою покращення функціонального стану печінки на тлі збільшення надходження в кров тварин амінокислоти метіоніну, яка використовується для синтезу протеїну. Детальне вивчення фракційного складу протеїнів у сироватці крові кролиць дослідних груп вказувало на зростання концентрації альбумінів. Так, концентрація альбумінів у сироватці крові тварин дослідних вірогідно зросла стосовно контролю на 4,05 (p<0,05) та 9,28 % (p<0,01) відповідно. Найвище зростання вмісту альбумінів у сироватці крові кролиць виявлено у 2-ій дослідній групі, яким згодовували хром-метіонін у вищій дозі.

Важливим аспектом є визначення ензимних систем крові, які характеризують метаболічний стан організму та вказують на взаємозв'язок між активністю амінотрансфераз та використанням вільних амінокислот в енергетичних процесах. Додавання хром-метіоніну до раціону кролиць призводить до зростання інтенсивності обмінних процесів у тварин 1-ої дослідної групи, на що вказує підвищення активності АлАТ у сироватці крові (табл. 3.56).

Таблиця 3.56.

**Активність ензимів переамінування у сироватці крові кролиць за згодовування хром-метіоніну перед заплідненням, n=4**

Показник	Група		
	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
	M±m	M±m	M±m
АсАТ, мкмоль/год. мл	0,45±0,08	0,41±0,07	0,38±0,02
АлАТ, мкмоль/год. мл	0,56±0,04	0,83±0,13	0,64±0,06

Вірогідних змін активності досліджуваних ензимів між контрольною та дослідними групами не було виявлено, що вказує на відсутність патологічних відхилень у печінці кролиць.

Морфометричні зміни в репродуктивних органах кролиць за згодовування хром-метіоніну в усіх дослідних групах підтверджуються змінами активності ензимів антиоксидантного статусу, ензимів переамінування протеїнів та вмісту загального протеїну.

Встановлено, що активність каталази після додавання кролицям до раціону хром-метіоніну в дозі 25 та 50 мкг/добу/голову впродовж 6-ти тижнів до запліднення вірогідно зросла у тварин 1-ої дослідної групи, тоді як у тварин 2-ої дослідної групи її активність менш виражена (табл. 3.57).



Таблиця 3.57.

**Активність ензимів антиоксидантного захисту в крові кролиць за  
згодовування хром-метіоніну,  $M \pm m$ ;  $n=4$**

Показник	Група		
	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
Каталаза, мкмоль/хв×мг протеїну	5,02±0,07	5,47±0,04*	5,32±0,28
СОД, ум.од./мг протеїну	0,412±0,02	0,438±0,02	0,380±0,08
ГП, мкмоль/мг протеїну за хв	42,07±1,30	54,02±1,40**	50,45±1,30*

Зміни активності каталази, на наш погляд, пов'язані з комплексом адаптаційних реакцій організму за згодовування хром-метіоніну, який з даних літератури збільшує активність інсуліну, підвищує інтенсивність метаболічних процесів, засвоєння глюкози та тригліцеридів, сприяє підвищенню виробництва енергії в організмі кролематок та збільшенню м'язової маси.

Ефективність ензимної ланки має вирішальне значення у підтримці прооксидантно-антиоксидантного балансу в організмі. Глутатіонпероксидаза (ГП) є найважливішим антиоксидантним ензимом, який каталізує розщеплення  $H_2O_2$  і гідропероксидів жирних кислот [84]. Встановлено, що ГП активність у сироватці крові кролиць 1-ої та 2-ої груп ( $p < 0,05 - 0,01$ ) була вірогідно вищою в порівнянні з показником контрольної групи. Водночас у кролиць обох дослідних груп вірогідні різниці у активності СОД у плазмі крові порівняно з контролем відсутні.

Встановлено, що після введення до раціону хром-метіоніну активність каталази в обох дослідних груп була вищою, ніж у контролі. Зокрема, активність ензиму в крові кролиць 1-ої дослідної групи вірогідно зросла порівняно з тваринами контрольної групи ( $p < 0,05$ ). Активність СОД та ГП у крові кролиць дослідних груп збільшується, що вказує на активування антиоксидантного захисту в організмі.

Додавання хрому до раціону кролиць у кількості 25 та 50 мкг/гол/добу проявляє інгібувальний вплив на кінцеві стадії гідропероксидного окиснення ліпідів в організмі самок (табл. 3.58).

*Таблиця 3.58.*

**Вміст продуктів ПОЛ у крові кролиць за різного вмісту хром-метіоніну в раціоні, n=4; M±m**

Показник	Група		
	Контрольна	Дослідна 1	Дослідна 2
ГПЛ, ум. од/мл	3,85±0,07	4,08±0,11	3,69±0,03
ТБК-активні продукти, нмоль/мл	2,46±0,06	1,8±0,06**	1,56±0,07***

Встановлено підвищення вмісту гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) у сироватці крові кролиць 1-ої дослідної групи у порівнянні з 2-ою дослідною групою, проте вірогідних змін між показниками дослідних груп та контрольної не спостерігалось.

Вміст ТБК-активних продуктів, які є кінцевими продуктами пероксидного окиснення ліпідів, у крові кролиць дослідних груп вірогідно знижувався по відношенню до контролю

У матці встановлено зростання кількості ГПЛ у тварин 1-ої дослідної групи та зниження у тварин 2-ої дослідної групи. У тканинах печінки не встановлено суттєвих міжгрупових різниць стосовно концентрації ГПЛ (табл. 3.59).

Концентрація ТБК-активних продуктів у тканинах печінки та матки 1-ої дослідної та контрольної груп була приблизно однаковою. Тоді як додавання до раціону кролиць хром-метіоніну у більшій дозі призвело до вірогідного зниження вмісту малонового діальдегіду в тканинах матки і печінки самиць 2-ої дослідної групи [253].

Таблиця 3.59.

**Вплив хром-метіоніну на концентрацію продуктів ПОЛ у тканинах  
кролиць, n=4; M±m**

Група	ГПЛ, ум. од/г протеїну	ТБК-активні продукти, нмоль/г протеїну
<i>Печінка</i>		
Контроль	2,79±0,12	2,6±0,05
Дослідна 1	2,77±0,10	2,55±0,06
Дослідна 2	2,68±0,03	2,38±0,03*
<i>Матка</i>		
Контроль	2,96±0,06	2,61±0,07
Дослідна 1	3,34±0,15	2,68±0,02
Дослідна 2	2,49±0,08**	2,21±0,02**

Аналіз показників активності ензимів системи антиоксидантного захисту в тканинах кролиць показав, що в 1-ій дослідній групі активність СОД, каталази, ГП мала тенденцію до підвищення, причому підвищення активності ГП було вірогідним у порівнянні з контрольною групою (табл. 3.60). Отже, результати досліджень виявили, що додавання до раціону кролиць 25 мкг/гол хром-метіоніну сприяє зростанню інтенсивності обмінних процесів в їх організмі, що підтверджується підвищенням активності каталази, аланінамінотрансферази у сироватці крові та загального протеїну і позитивно впливає на репродуктивну здатність кролематок — запліднення, ріст і розвиток ембріонів та їх імплантацію.

Загалом додавання хром-метіоніну до раціону кролиць в обох досліджуваних дозах проявляє інгібувальний вплив на кінцеві стадії ПОЛ у тканинах, позитивно впливає на показники загального аналізу крові та біохімічні показники крові, підвищує активність ензимів тканинного обміну,

і як наслідок, підвищує в організмі кролиць інтенсивність ембріонально-маткових взаємодій в ранній період вагітності.

Таблиця 3.60.

**Вплив хром-метіоніну на активність ензимів системи антиоксидантного захисту в тканинах кролиць, n=4; M±m**

Група	СОД, ум.од./мг протеїну	Каталаза, ммоль/хв×мг протеїну	ГП активність, ммоль GSH/хв×мг протеїну
<i>Печінка</i>			
Контроль	33,17±0,14	57,52±0,29	37,66±0,14
Дослідна 1	35,33±0,13	58,21±0,25	42,18±0,19***
Дослідна 2	32,83±0,05	56,87±0,36	36,32±0,16**
<i>Матка</i>			
Контроль	34,50±0,14	38,72±0,24	32,59±0,36
Дослідна 1	36,63±0,15	41,06±0,16**	39,63±0,5***
Дослідна 2	33,39±0,22	38,56±0,29	31,78±0,20

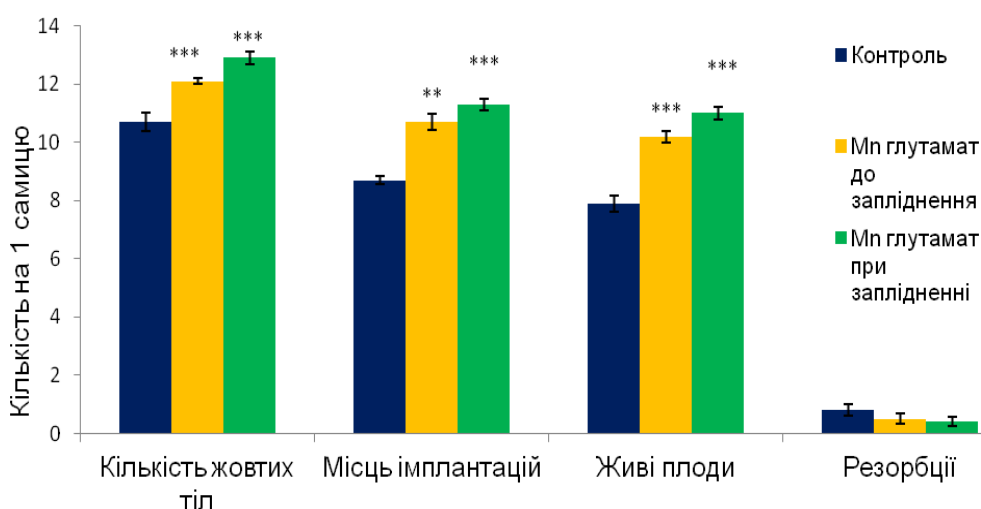
Виробнича перевірка проведена у приватному господарстві ТзОВ «Карпатський паннон» Мукачівського району, Закарпатської області на 80 кролематках парувального віку показала, що згодовування хром-метіоніну в передовуляторний період є ефективним для стимуляції овуляторної функції кролиць, підвищення ембріонально-маткового сигналу та приживлення ембріонів.

Результати виробничої перевірки виявили, що додавання хром-метіоніну до основного раціону посилює ефект множинної овуляції, що супроводжується збільшенням кількості жовтих тіл, зниженням ембріональної смертності в доімплантаційний період у 1-ій дослідній групі, до основного раціону вносили хром-метіонін в дозі 10 мкг/гол на добу, та 2-й

дослідній групі, кролицям якої додавали хром-метіонін в дозі 25 мкг/гол на добу та у постімплантаційний період у 3-й дослідній групі (кількість хром-метіоніну становила 50 мкг/гол/добу).

**3.5.3. Запліднювальна та імплантаційна здатність самиць щурів за впливу мангану і цинку глутамату.** Метою даного етапу досліджень було вивчити вплив введення цинку та манган глутамату у формі ліпосомальних препаратів на запліднюваність та імплантаційну здатність самок щурів.

Аналіз морфологічних показників репродуктивної здатності самиць щурів, дослідним групам яких вводили ліпосомальний препарат глутамату мангану до- та при заплідненні, виявив вірогідне зростання кількості жовтих тіл вагітності в яєчниках ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ) та кількості імплантацій ембріонів на одну самку ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) порівняно з контрольною групою (рис. 3.34).

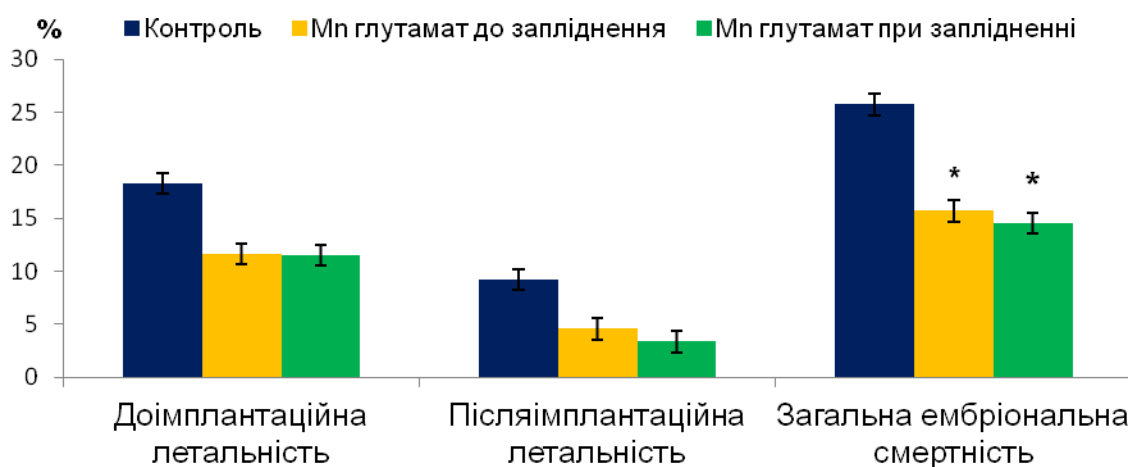


**Рис. 3.34. Показники ембріогенезу щурів за впливу манган глутамату,  $M \pm m$ ,  $n=10$**

Введення глутамату мангану сприяє ембріональному розвитку, що підтверджується вірогідним підвищенням кількості живих плодів на 1 самицю на 16,09 % та 26,44 % у 1-й та 2-й дослідних групах відносно

контрольної групи. Подібні відмінності виявлені також стосовно кількості резорбцій плодів між дослідною та контрольними групами [265]

При порівнянні показників ембріонального розвитку за дії глютамату мангану встановлено вірогідне зниження загальної ембріональної смертності ( $p < 0,05$ ), а також летальності в передімплантаційний та постімплантаційний періоди в обох дослідних групах порівняно з контролем (рис. 3.35).



**Рис. 3.35. Показники ембріональних втрат за впливу мангану глютамату,  $M \pm m$ ,  $n=10$**

За введення самицям щурів глютамату цинку до- та при заплідненні відмічено зростання кількості жовтих тіл вагітності в яєчниках та кількості місць імплантацій на одну самку порівняно з контрольною групою. Введення глютамату цинку до запліднення призводило до зменшення кількості місць резорбцій та вірогідного зниження передімплантаційної загибелі ембріонів (табл. 3.61).

Результати морфологічних показників репродуктивної системи та ембріонального розвитку вказують про вищу ефективність застосування глютамату цинку у підготовчий період до запліднення самиць, що підтверджено вірогідно вищим показником кількості живих плодів у

порівнянні до показників контрольної ( $p < 0,001$ ) та дослідної групи ( $p < 0,01$ ), тваринам якої вводили цинк глютамат при заплідненні.

Таблиця 3.61.

Показники ембріонального розвитку за дії цинк глютамату,  $M \pm m$ ,  $n=10$ 

Показник	Група		
	Контроль	Дослідна 1 (Zn до запліднення)	Дослідна 1 (Zn при заплідненні)
Кількість жовтих тіл на одну самку	11,5 $\pm$ 0,34	13,2 $\pm$ 0,21**	11,5 $\pm$ 0,26
Кількість місць імплантацій	9,5 $\pm$ 0,16	11,9 $\pm$ 0,23	10,2 $\pm$ 0,29
Кількість живих плодів	8,7 $\pm$ 0,26	11,4 $\pm$ 0,22*** <sup>a</sup>	9,6 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>
Кількість місць резорбцій	0,8 $\pm$ 0,13	0,5 $\pm$ 0,17	0,7 $\pm$ 0,15
Передімплантаційна летальність, %	16,59 $\pm$ 2,23	9,52 $\pm$ 2,39*	12,91 $\pm$ 2,17
Постімплантаційна летальність, %	6,22 $\pm$ 2,8	4,05 $\pm$ 1,77	3,85 $\pm$ 1,58
Загальна ембріональна летальність, %	23,15 $\pm$ 3,32	13,26 $\pm$ 2,59	16,35 $\pm$ 2,19

**Примітка:** \* – вірогідна відмінність порівняно до контролю; a:b – відмінність між показниками дослідних груп ( $P < 0,01$ ).

Підсумовуючи отримані результати даного етапу роботи, можна констатувати, що введення глютамату мангану у формі ліпосомальної емульсії ефективніше впливає на репродуктивну систему та процеси ембріонального розвитку при заплідненні самок щурів, тоді як дія глютамату

цинку найкраще виявляється при завчасного застосування за 7 діб до запліднення самиць.

При проведенні морфологічних досліджень яєчників встановлено підвищення як абсолютних, так і відносних показників маси яєчників самиць щурів у дослідних групах, яким вводили глутамат мангану та цинку порівняно з контрольною групою (табл. 3.62). Найвищими ці показники були у першій та другій дослідних групах тварин за дії глутамату мангану.

Таблиця 3.62.

**Біометричні параметри яєчників щурів за дії ліпосомальних препаратів глутатамів мангану та цинку, n=10; M±m**

Група	Абсолютна маса яєчників, мг	Відносна маса яєчників, %	Індекс впливу	Маса щурів (г)
Контроль	74,77±0,68	0,0402	-	185,99±1,55
Дослідна 1 (Mn до запліднення)	79,14±0,61***	0,0418	1,06	189,51±0,81
Дослідна 2 (Mn при заплідненні)	85,51±0,73***	0,0451	1,14	189,64±0,88
Дослідна 3 (Zn до запліднення)	77,48±0,69**	0,0411	1,04	188,54±1,42
Дослідна 4 (Zn при заплідненні)	77,23±0,75*	0,0415	1,03	186,07±2,36

Введення глутамату цинку до- та при заплідненні самиць призводить до вірогідного збільшення сумарної маси яєчників у порівнянні з показником контрольної групи. Введення глутамату цинку та мангану позитивно впливає



на масометричні показники яєчників, що підтверджується індексом стимуляції, який складає 1,03 та 1,14 відповідно.

Вагітність характеризується глибокими змінами обміну речовин та іншими фізіологічними змінами, що залучають фактично кожен систему органів. Значні зміни спостерігаються у ліпідному обміні впродовж вагітності. Посилення ліпідного обміну зумовлено змінами концентрацій естрогенів, прогестерону і плацентарного лактогену, а також перенаправленням енергетичного обміну в сторону ліпідного для компенсації підвищених енергетичних потреб організму за вагітності.

Встановлено, що рівень загального холестеролу вірогідно підвищувався у 1-ій та 3-ій дослідних групах, самкам яких глютават мангану та цинку вводили за 7 діб до запліднення ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ), тоді як у 2-ій та 4-ій дослідних групах цей показник був на рівні контрольної групи (табл. 3.63).

Таблиця 3.63.

**Вміст ліпідів у сироватці крові самок щурів за дії ліпосомальних препаратів глютаватів мангану та цинку,  $n=10$ ;  $M \pm m$**

Показник	Контроль	Дослідна 1 (Mn до запліднення)	Дослідна 2 (Mn при заплідненні)	Дослідна 3 (Zn до запліднення)	Дослідна 4 (Zn при заплідненні)
ХС, ммоль/л	1,29±0,09	1,57±0,05*	1,32±0,07 <sup>a</sup>	1,67±0,06** <sup>b</sup>	1,39±0,07
ТГ, ммоль/л	2,53±0,06	2,69±0,04	2,73±0,05*	2,76±0,05*	2,63±0,13
ЛПНЩ, ммоль/л	0,20±0,02	0,32±0,01**	0,27±0,02 <sup>a</sup>	0,36±0,04** <sup>b</sup>	0,22±0,01 <sup>c^^</sup>
ЛПВЩ, ммоль/л	0,79±0,07	1,03±0,03**	0,79±0,05	1,01±0,04**	0,90±0,04

**Примітка.** У цій табл. : \* – вірогідна відмінність порівняно до контролю; <sup>a</sup>:<sup>b</sup> –  $P < 0,05$ ; <sup>^^</sup>:<sup>b</sup> –  $P < 0,001$  відмінність між показниками дослідних груп.

Зростання рівня холестеролу дозволить забезпечити його надлишок, необхідний в період вагітності для синтезу плацентарного прогестерону та передачі холестеролу через плаценту плоду, особливо при завчасному забезпеченні цинк глутаматом. Це підтверджується, зокрема, вірогідною відмінністю між показниками загального холестеролу у тварин дослідних груп при введенні манган глутамату при заплідненні (Д2) та цинк глутамату до запліднення (Д3) ( $p < 0,05$ ).

Введення ліпосомальних препаратів глутамату мангану та цинку викликало підвищення рівня ТГ. У порівнянні з контролем у 1-ій, 2-ій та 3-ій дослідних групах відмічено вірогідне збільшення кількості ТГ. Зростання рівня триацилгліцеролів підвищує здатність незамінних і замінних жирних кислот до плацентарної передачі плоду, що забезпечує живлення плодів та їх розвиток.

За введення самкам щурів глутамату мангану та цинку до запліднення спостерігалось вірогідне зростання ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) ( $p < 0,001$ ). У самиць 2-ої дослідної групи, які отримували глутамат мангану при заплідненні рівень ЛПНЩ теж був вірогідно вищим порівняно з контролем ( $p < 0,01$ ), тоді як за введення глутамату цинку при заплідненні рівень ЛПНЩ був наближеним до контрольних значень. Оскільки ліпопротеїни є основними транспортерами ТГ та ХС, тому між ними і ліпопротеїнами, що їх транспортують виявлено зв'язок в дослідних групах.

Вміст ЛПВЩ у 1-ій та 3-ій дослідних групах, тваринам яких ліпосомальні препарати глутамату мангану та цинку вводили до запліднення, був вірогідно вищим порівняно з контролем.

У результаті проведених досліджень встановлено, що глутамат цинку та мангану підвищують показники ліпідного обміну, забезпечують загальну адаптацію обміну речовин в організмі самки щурів при вагітності до посиленої передачі поживних речовин плоду. Манган активно впливає на обмін протеїнів, вуглеводів і жирів. Важливою також вважається здатність

Мангану підсилювати ліпотропну дію холіну [232] та підтримувати певний рівень холестеролу в крові [161].

Отримані результати щодо введення глютамату мангану та цинку до запліднення позитивно впливають на обмін речовин самки у підготовчий до вагітності період, зокрема сприяють посиленню ліпідного обміну, що забезпечує потреби організму в енергетичних і пластичних компонентах, синтезі стероїдних гормонів. Така потреба особливо актуальна за підготовки до овуляції та розвитку жовтого тіла. Зазначені зміни вказують про важливість забезпечення самки мікроелементами, зокрема Манганом та Цинком у підготовчий перед вагітністю період, що дозволить створити сприятливі умови для синтезу стероїдів, необхідних для формування гормонального фону та підготовки матки до імплантації і розвитку ембріонів.

Отже, у результаті досліджень встановлено, що введення глютамату цинку та мангану у формі ліпосомальних препаратів за 7 дб до запліднення та при заплідненні проявляє стимулювальну дію на репродуктивну систему самиць та ембріогенез, сприяє підвищенню морфо-функціонального стану і збільшує масометричні параметри яєчників, число жовтих тіл вагітності, підвищує кількість живих плодів за рахунок зниження до- та постімплантаційної смертності, а також викликає позитивний вплив на корекцію ліпідного обміну.

З метою розробки препаратів пролонгованої дії для стимуляції репродуктивної здатності та посилення ембріонально-маткової взаємодії досліджено вплив селеновмісного препарату пролонгованої дії на самицях щурів.

При дослідженні рівня запліднення встановлено, що індекс вагітності у контрольній групі складав 80%, у першій дослідній – 100%, а у другій дослідній – 40%. Отримані результати вказують про важливу роль селену на репродуктивну функцію, запліднення та збереження вагітності. Селен входить до складу понад 30 селен-протеїнів, які окрім підвищення антиоксидантної активності впливає на статеве дозрівання, репродуктивну

функцію [688], нормалізує обмін нуклеїнових кислот і білків, обмін простагландинів, простациклінів [114]. Дефіцит селену призводить до тиреоїдної дисфункції. Так, доведено важливість тиоредоксин редуктази (TRx) у розвитку ембріонів, процесах диференціації та морфогенезу [430] внаслідок порушення синтезу ДНК за рахунок накопичення неактивних форм рибонуклеотид редуктаз [240].

Виявлені морфометричні особливості імплантації ембріонів при застосуванні підшкірного введення пролонгованого препарату селену в обох дослідних групах підтверджуються змінами активності ферментів антиоксидантного статусу (табл. 3.64).

*Таблиця 3.64.*

**Показники антиоксидантної активності в еритроцитах крові самиць щурів за різних умов введення селенвмісного препарату, n=5; M±m**

Група	Введення препарату	ГП, нмоль GSH/хв×мг протеїну	Каталаза, мкмоль/хв×мг протеїну	Відновлений глутатіон, мкмоль/л
Контроль	-	16,12±1,09	5,77±0,09	0,12±0,007
Дослідна 1	3 рази до запліднення	19,41±0,50	5,87±0,14	0,13±0,007
Дослідна 2	3 рази до запліднення 2 рази після запліднення	17,29±0,80	5,65±0,12	0,11±0,01

Відстежувалася тенденція до збільшення активності ензимів АОС крові за впливу селенвмісного препарату: зростання активності ГП у 1,20 разів в 1-ій дослідній групі та у 1,07 разів у крові самиць 2-ї дослідної групи, тоді як зростання активності каталази та відновленого глутатіону відзначено лише у 1-ій дослідній групі за введення препарату до запліднення. Проте вірогідно вираженого впливу препарату селену на рівень активності ензимів АОС крові

не відзначено. Це може вказувати про стимулюючий вплив на стан клітин крові та систему антиоксидантного захисту організму вагітних самиць. Доведено, що ГП захищає еритроцити від передчасного старіння та гемолізу, а нейтрофіли і макрофаги – від дії  $H_2O_2$  та органічних пероксидів, оскільки мають високу спорідненість з пероксидаціями [452, 511].

Підтвердженням біологічного впливу пролонгованого препарату селену є також вірогідні відмінності показників антиоксидантної активності репродуктивних органів самок щурів дослідних груп відносно показника контрольної групи (табл. 3.65).

*Таблиця 3.65.*

**Вміст ТБК-активних продуктів та ГПЛ у тканинах репродуктивних органах самиць щурів за введення селенвмісного препарату,  $n=5$ ;  $M \pm m$**

Група	Тканини	
	Яєчники	Матка
ТБК-активні продукти (нмоль/г протеїну)		
Контроль	7,22±0,23	10,83±0,28
Дослідна 1	11,23±0,4**	21,69±1,8**
Дослідна 2	6,04±0,16**	10,04±0,25
Гідроперекиси ліпідів (ум. од/г протеїну)		
Контроль	2,27±0,28	5,98±0,29
Дослідна 1	3,02±0,15*	8,13±1,72
Дослідна 2	1,3±0,12**	3,09±0,05**

Вміст ТБК-активних продуктів ПОЛ вірогідно зростав у тканинах яєчників ( $p<0,01$ ) та матки ( $p<0,01$ ) тварин 1-ої дослідної групи, які отримували препарат селену до запліднення, тоді як у тварин 2-ої дослідної групи, яким підшкірно вводили препарат до та після запліднення, вміст ТБК-активних продуктів у репродуктивних органах знижувався (табл. 3.65).

Аналогічна тенденція також спостерігається при аналізі даних вмісту

гідропероксидів ліпідів. Так, вміст ГПЛ, які утворюються при взаємодії пероксидних радикалів із молекулами жирних кислот, вірогідно знижувався у тканинах яєчників ( $p<0,01$ ) та матки ( $p<0,01$ ) тварин 2-ої дослідної групи, що вказує на інгібуючий вплив селену на утворення гідропероксидів як проміжної ланки пероксидних процесів.

Утворення продуктів ПОЛ регулюється системою антиокисдатного захисту, яка запобігає розвитку вільно радикальних реакцій, підтримує високу активність окисно-відновних процесів, забезпечує елімінацію кінцевих метаболітів.

Активність Se-залежного ензиму глутатіонпероксидази (ГП, КФ 1.11.1.9), який каталізує відновлення  $H_2O_2$  до води та органічні гідроперокси до гідросполук, вірогідно підвищувався у тканинах яєчника ( $p<0,05$ ) та матки ( $p<0,05$ ) тварин 1-ої дослідної групи (табл. 3.66), індекс вагітності яких становив 100%.

*Таблиця 3.66.*

**Активність ГП у тканинах репродуктивних органах самиць щурів за введення селенвмісного препарату, нмоль/хв×мг протеїну, n=5;  $M\pm m$**

Група	Тканини	
	Яєчники	Матка
Контроль	14,21±0,12	15,74±0,06
Дослідна 1	15,31±0,11*	16,92±0,04*
Дослідна 2	13,62±0,48	14,7±0,23**

Рівень активності ензиму у самиць 2-ої дослідної групи, індекс вагітності яких становив 40% знижувався відносно показника контрольної групи. Одержані дані показали залежність активності ензиму ГП від індексу вагітності – у самок з високим рівнем запліднення активність ензимів АОЗ та перебіг вільнорадикальних процесів у тканинах репродуктивних органів зростає.

Каталітична активність ГП за достатнього надходження селену

підвищується, що запобігає накопиченню вільних радикалів та розвитку оксидативного стресу, що є особливо актуальним при вагітності. Під час вагітності в організмі матері відбувається низка біохімічних змін, зокрема, збільшується споживання кисню та концентрація ненасичених жирних кислот, що активує пероксидне окислення ліпідів [81]. У зв'язку з цим виникає необхідність пошуку та використання мікроелементів для нормалізації прооксидантно-антиоксидантної рівноваги за дії стресових чинників, зокрема при вагітності.

#### **3.5.4. Вплив комплексного ліпосомального препарату органічних сполук мікроелементів на репродуктивну функцію у тварин**

За результатами попередніх експериментальних досліджень визначено позитивний вплив хром-метіоніну, глутамату цинку та мангану на відтворювальну здатність самок, морфо-функціональний стан різних систем та обмінні процеси в організмі у підготовчий до запліднення та ранній ембріональний розвиток, що дозволило нам поєднати органічні та мінеральні сполуки цих біогенних елементів та ввести їх у лісипомальній формі до складу препарату “Ліпоорганік”.

Результати досліджень показали, що в 1-ій дослідній групі, кролицям якої вводили ліпосомальний препарат за 14 діб до осіменіння, виявлено збільшення кількості жовтих тіл вагітності в яєчниках, місць імплантацій та кількості живих ембріонів у порівнянні до контрольної групи (табл. 3.67).

Введення кролицям 2-ої дослідної групи ліпосомального препарату органічних сполук мікроелементів при осіменінні, сприяє збільшенню кількості жовтих тіл вагітності, кількості живих плодів, порівняно до аналогічних показників контрольної та 1-ої дослідної груп.

У 1-ій дослідній групі, кролицям якої вводили ліпосомальний препарат за 14 діб до запліднення, виявлено найнижчий відсоток доімплантаційної загибелі плодів – 10,2 % проти 11,1 % у контрольній та 11,3 % у 2-ій

дослідній групі, що отримувала препарат при осіменінні. На нашу думку, введення ліпосомального препарату органічних сполук цинку, а особливо, мангану до осіменіння, забезпечує сприятливі умови для збереження та розвитку плодів.

Таблиця 3.67.

**Морфологічні дослідженнями репродуктивних органів кролиць за дії комплексного препарату, n=5; M±m**

Показник	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
Кількість жовтих тіл на одну самку	10,8±1,02	11,8±0,74	12,4±0,24
Кількість місць імплантацій	9,8±1,02	10,8±0,74	11,2±0,37
Кількість живих плодів	9,2±1,16	10,2±1,14	10,8±0,37
Кількість місць резорбцій	0,4±0,24	0,4±0,24	0,2±0,18
Доімплантаційна летальність, %	11,1	10,2	11,3
Постімплантаційна летальність, %	4,2	3,7	1,82
Загальна ембріональна смертність, %	14,8	13,5	12,9

Проведені дослідження показали, що відсоток постімплантаційної загибелі плодів був найнижчим у 2-ій дослідній групі – 1,82 %, тоді як у 1-ій та контрольній групах він становив відповідно 3,7 % та 4,2 %. Внаслідок цього, показник загальної ембріональної смертності плодів у 1-ій та 2-ій дослідних групах знижувався у порівнянні до контролю (контроль – 14,8 %; 1-ша група – 13,5 %, 2-га група – 12,9 %), в основному, за рахунок доімплантаційної летальності. Аналогічні зміни можуть пояснюватися позитивним впливом ліпосомального препарату, введення якого співпадав з доімплантаційним та імплантаційним періодом. На наступному етапі дослідження було проаналізовано вплив введення ліпосомального препарату



органічних мікроелементів на гематологічні показники периферичної крові кролиць (табл. 3.68).

Таблиця 3.68.

**Гематологічні показники периферичної крові кролиць за дії  
комплексного препарату, n=5; M±m**

Показник	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
Кількість еритроцитів, $10^{12}/л$	5,44±0,52	5,08±0,20	4,79±0,30
Вміст гемоглобіну, г/л	128,2±2,48	124,6±5,92	120,4±5,92
Гематокрит, %	47,16±,57	49,32±2,01	45,88±2,41
Середній об'єм еритроцита, мкм <sup>3</sup>	94,62±0,54	97,66±0,81	101,56±1,53
Середній вміст гемоглобіну, пг	22,84±0,43	24,18±0,42	24,48±0,30**
Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, мг×моль/л	242,8±2,24	249,4±1,92	248,6±5,44
Коливання розміру еритроцитів, %	9,1±0,16	8,82±0,29	8,76±0,45

У результаті проведених досліджень встановлено, що за впливу ліпосомального препарату органічних сполук мікроелементів зростає середній об'єм еритроцитів та середній вміст гемоглобіну ( $p<0,01$ ), а також виявлена тенденція до підвищення середньої концентрації гемоглобіну в еритроцитах обох дослідних груп, що, ймовірно, пов'язано з участю Мангану в еритропоезі [59, 104]. Вища концентрація гемоглобіну в еритроцитах крові кролиць дослідних груп вказує на вищий рівень Оксигену та інтенсивність водно-сольового обміну в організмі за дії ліпосомального препарату органічних мікроелементів.

Величина гематокриту дозволяє оцінити співвідношення між об'ємом плазми і форменими елементами крові, а індекси крові характеризують співвідношення між еритроцитами й насиченням їх гемоглобіном за норми та патології. Не встановлено вірогідних змін в концентрації гемоглобіну,

величині гематокриту та кількості еритроцитів між контрольною і дослідними групами. Отримані дані можна пояснити посиленням еритропоезу в організмі кролиць за сукрільності та підвищеною потребою тканин у Оксигені, що призводить до зменшення кількості еритроцитів і рівня гемоглобіну в крові. Такі гемодинамічні зміни у гестаційний період є адаптацією організму до вагітності.

Щоб оцінити морфологічні зміни у складі крові кролиць за впливу ліпосомального препарату органічних мікроелементів, здійснювали підрахунок загальної кількості лейкоцитів і співвідношення їх окремих видів (табл. 3.69).

*Таблиця 3.69.*

**Лейкограма крові кролиць за дії комплексного препарату, n=5; M±m**

Група	Лейкоцити, $10^9/\text{л}$	Лімфоцити, %	Моноцити, %	Гранулоцити, %
Контроль	9,74±0,53	24,28±1,18	12,30±0,16	63,42±1,32
Дослідна 1	9,58±0,58	29,9±1,55**	12,34±0,77	57,76±1,95**
Дослідна 2	11,9±0,92	26,84±1,49	10,96±0,91	62,2±5,50

У кролиць 2-ої дослідної групи, яким вводили препарат під час осіменіння, спостерігається тенденція до зростання кількості лейкоцитів, що є характерним при вагітності та зумовлено імунологічною перебудовою організму. Збільшення загальної кількості лейкоцитів проходить одночасно зі змінами в лейкоцитарній формулі. За підрахунку відсоткового співвідношення лейкоцитів відмінностей між дослідними групами не виявлено. Проте у 1-ій дослідній групі кролиць, яким вводили препарат за 14 днів до осіменіння, відмічається підвищення кількості лімфоцитів за рахунок зниження відсотку гранулоцитів.

Із настанням вагітності в організмі проходять зміни гомеостазу, які супроводжуються змінами ряду метаболічних процесів [211] і направлені на

підтримку вагітності та розвиток плоду. Вагітність викликає зміни у різних ланках обміну речовин, зокрема перебудову ліпідного обміну. Ліпіди відіграють важливу роль у життєздатності організму: вони є енергетичними речовинами, структурними компонентами клітин та вихідними продуктами для синтезу біологічно активних речовин.

Проведені дослідження показників ліпідного обміну виявили, що рівень загального холестеролу підвищувався у 1-ій дослідній групі кролиць, яким вводили препарат за 14 діб до осіменіння (табл. 3.70).

*Таблиця 3.70.*

**Показники вмісту ліпідів у сироватці крові кролиць за дії  
комплексного препарату, ммоль/л (n=5; M±m)**

Показник	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
ХС	1,35±0,12	1,61±0,09	1,44±0,22
ЛПВЩ	0,70±0,09	0,73±0,09	0,69±0,07
ЛПНЩ	0,82±0,16	1,35±0,04*	1,03±0,19
ТГ	1,03±0,15	1,23±0,04	1,08±0,09

У 2-ій дослідній групі цей показник зростає, проте різниця не була вірогідною. Підвищення рівня холестеролу зумовлене активуванням метаболічних процесів та необхідністю його використання як попередника для синтезу стероїдних гормонів.

Введення ліпосомального препарату кролицям обох дослідних груп, збільшувало вміст триацилгліцеролу за рахунок їх накопичення в ЛПНЩ, що викликало підвищення рівня атерогенних фракцій ліпопротеїнів

Вміст ХС ЛПВЩ у 1-ій дослідній групі був вищим за відповідні показники контрольної групи. Проте, за умов введення препарату за осіменіння кролиць 2-ої дослідної групи рівень ЛПВЩ залишався незмінним у порівнянні до контрольних значень. Підвищення показників ліпідного обміну в сироватці крові кролиць є наслідком компенсаторної реакції,

направленої на метаболічне забезпечення плодово-плацентарної системи за сукрільності.

У результаті проведених досліджень системи антиоксидантного захисту виявлено, що вміст ТБК активних продуктів у крові кролиць дослідних груп був вірогідно нижчим, ніж у тварин контрольної групи (табл. 3.71).

*Таблиця 3.71.*

**Вміст кінцевих продуктів окисної модифікації ліпідів та протеїнів у крові кролиць за дії комплексного препарату, n=5; M±m**

Група	ОМП <sub>370</sub> , нмоль/г протеїну	ОМП <sub>430</sub> , нмоль/г протеїну	ТБК-активні продукти, нмоль/мл
Контроль	25,72±3,79	18,33±3,49	2,64±0,06
Дослідна 1	9,37±1,77*	5,41±1,40*	1,76±0,06**
Дослідна 2	11,32±4,02*	17,84±4,12	1,58±0,07**

Встановлено зниження вмісту альдегідних і кетонів похідних окисної модифікації протеїнів у крові кролиць дослідних груп порівняно з показниками тварин контрольної групи. Так, відзначене вірогідне зниження ОМП<sub>370</sub> в крові тварин 1-ої та 2-ої дослідних груп, а також ОМП<sub>430</sub> – у 1-ій дослідній порівняно з аналогічними показниками тварин контрольної групи.

Відомо, що окиснені ліпіди можуть взаємодіяти з рецепторами пероксисомальних проліфераційних чинників, які виконують роль активаторів антиоксидантних ензимів, зокрема каталази. Виявлено, що активність каталази була нижчою у крові дослідних кролиць порівняно з рівнем її активності у крові контрольної групи тварин, що пов'язано з її роллю в інактивації окисних процесів і це проявилось відповідним зниженням вмісту продуктів ПОЛ та ОМП. Встановлено, що у крові дослідних тварин активність церулоплазміну, який бере активну участь у виведенні продуктів розпаду клітин і субклітинних структур із зони запалення, зростала. Зокрема, у першій дослідній групі зростання було

вірогідним, що свідчить про активування цієї ланки антиоксидантного захисту у відповідь на введення препарату (табл. 3.72).

Таблиця 3.72.

**Активність антиоксидантних ензимів у крові кролиць за дії  
комплексного препарату, n=5; M±m**

Група	Каталаза, мкмоль/хв×мг протеїну	Церулоплазмін, мг/мл
Контроль	1,82±0,25	27,63±5,81
Дослідна 1	0,92±0,27	47,42±5,74
Дослідна 2	0,71±0,16**	25,37±0,55

Згідно з даними літератури, фізіологічний перебіг вагітності характеризується вираженням окислювальним стресом внаслідок дисбалансу процесів вільного радикального окислення ліпідів та антиоксидантної системи захисту [118]. Під час вагітності спостерігається надмірна продукція вільних радикалів кисню тканиною плаценти, що зумовлено синтезом та секрецією плаценти протизапальних цитокінів, а також низькою активністю антиоксидантних ензимів клітин трофобласта. Контрольований оксидативний стрес відіграє роль у ремоделюванні тканини плаценти та є необхідним для виконання функцій плаценти, зокрема направлений на формування компенсаторно-приспосувальних реакцій [144].

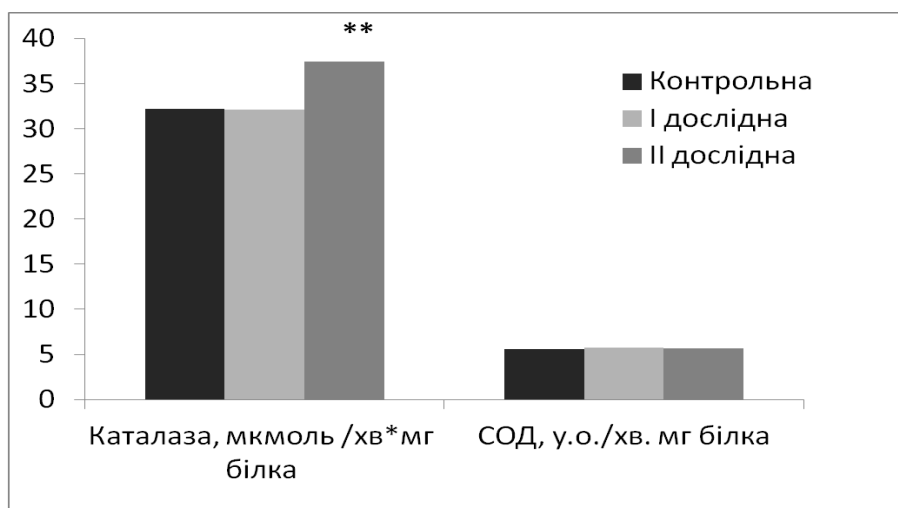
За дослідження вмісту ТБК-активних продуктів у тканинах репродуктивних органів, встановлено, що їх концентрація вірогідно знижувалась у тканині матки кролиць обох дослідних груп ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ). Вміст ГПЛ у матці кролиць 1-ої дослідної груп істотно не відрізнявся від показників контрольної групи. Вміст дієнових конюгатів у гомогенаті матки обох дослідних груп знижувався порівняно з контрольною групою на 16 % та 22 % відповідно ( $p<0,05-0,01$ ) (табл. 3.73).

Таблиця 3.73.

**Вміст кінцевих продуктів окисної модифікації ліпідів та протеїнів у  
матці кролиць за дії комплексного препарату, n=5; M±m**

Група	ТБК- активні продукти, нмоль/г протеїну	ГПЛ, ум.од./мл	ОМП <sub>370</sub> , нмоль/г протеїну	ОМП <sub>430</sub> , нмоль/г протеїну	Дієнові конюгати, нмоль/г протеїну
Контроль	1,14±0,04	0,49±0,03	36,75±1,38	27,22±1,78	0,79±0,05
Дослідна 1	0,92±0,06*	0,48±0,02	33,55±0,72	24,97±0,91	0,62±0,03**
Дослідна 2	0,87±0,03**	0,57±0,01*	18,16±0,82**	15,93±1,68**	0,66±0,02*

Підвищене кровонаповнення плаценти впродовж вагітності сприяє високій локальній концентрації вільного кисню у міжворсинчатому просторі, що супроводжується активуванням антиоксидантних механізмів.



**Рис. 3.36. Активність каталази та СОД у тканині матки кролиць за впливу комплексного препарату**

За дослідження активності ензимів антиоксидантного захисту встановлено, що після введення ліпосомального препарату органічних форм

мікроелементів при осіменінні активність каталази у ендометрії кролиць 2-ої дослідної групи вірогідно зросла ( $p<0,01$ ) порівняно до показника контрольної групи. У 1-ій дослідній групі рівень ензиму знаходився на рівні контрольних величин (рис. 3.36). Активність СОД у матці кролиць обох дослідних груп була вищою в порівнянні з показником контрольної групи, однак вірогідних різниць між групами не виявлено.

Спостерігали вірогідне підвищення вмісту альдегідних і кетонів похідних ОМП у печінці кролиць 2-ої дослідної групи порівняно з показниками тварин контрольної групи (табл. 3.74). У тварин 1-ої дослідної групи зафіксували тенденцію до зниження цих показників. Таку ж тенденцію відзначили й у концентрації ТБК-активних продуктів та дієнових кон'югатів у печінці тварин дослідних груп.

Таблиця 3.74.

**Вміст кінцевих продуктів окисної модифікації ліпідів та протеїнів у печінці кролиць за дії комплексного препарату,  $n=5$ ;  $M\pm m$**

Група	ОМП <sub>370</sub> , нмоль/г протеїну	ОМП <sub>430</sub> , нмоль/г протеїну	ТБК-активні продукти, нмоль МДА/г протеїну	Дієнові кон'югати, нмоль/г протеїну	ГПЛ, ум.од./мл
Контроль	16,68 $\pm$ 1,73	12,44 $\pm$ 0,69	17,03 $\pm$ 1,05	1,37 $\pm$ 0,1	0,53 $\pm$ 0,02
Дослідна 1	14,01 $\pm$ 1,25	11,23 $\pm$ 1,16	13,13 $\pm$ 0,42	1,31 $\pm$ 0,11	0,47 $\pm$ 0,03
Дослідна 2	7,13 $\pm$ 1,03*	5,66 $\pm$ 0,66**	15,03 $\pm$ 1,11	1,04 $\pm$ 0,28	0,49 $\pm$ 0,02

Активність каталази у печінці кролиць вірогідно зростала у тварин 2-ої дослідної групи порівняно з аналогічним показником контрольних тварин (табл. 3.75).

Таблиця 3.75.

**Активність ензимів антиоксидантного захисту в тканині печінки  
кролиць за дії комплексного препарату, n=5; M±m**

Група	Каталаза, мкмоль/хв×мг протеїну	СОД, у.о. /мг протеїну
Контроль	2,25±0,36	5,35±0,24
Дослідна 1	4,14±0,46	5,84±0,18
Дослідна 2	2,47±0,24	5,51±0,12

Отже, введення ліпосомального препарату органічних сполук мікроелементів до- та після осіменіння викликає збільшення концентрації загального холестеролу, тригліцеридів і холестеролу ЛПНЩ та ЛПВЩ, знижує інтенсивність окисних процесів, що проявляється у вірогідному зменшенні кінцевих продуктів ПОЛ та окисної модифікації протеїнів у крові тварин обох дослідних груп, підвищує активність церулоплазміну та позитивно впливає на стан клітинних мембран ендометрію завдяки зниженню окисних процесів та підвищенню активності ензимів антиоксидантного захисту.

**3.5.5. Дія комплексного препарату органічних сполук мікроелементів за різних способів його застосування на інтенсивність метаболічних процесів, антиоксидантний статус і репродуктивну функцію у кролиць**

Метою досліджень було вивчення впливу згодовування кролицям комплексного ліпосомального препарату органічних сполук мікроелементів у формі препаратів до складу гранульованого комбікорму та додаткових ін'єкцій препарату на перебіг обмінних процесів та відтворювальну здатність кролиць у ранній період сукрільності.



Результати досліджень показали, що додавання до корму кролицям 1-ої дослідної групи ліпосомального препарату органічних сполук мікроелементів за 14 діб до осіменінні сприяє збільшенню кількості жовтих тіл вагітності, місць імплантацій та кількості живих плодів, порівняно до аналогічних показників контрольної. Так, кількість жовтих тіл вагітності та місць імплантацій у 1-ій дослідній групі становило відповідно  $11,0 \pm 0,45$  та  $10,6 \pm 0,74$  проти  $10,4 \pm 0,67$  та  $9,4 \pm 0,4$  у контролі (табл. 3.76).

За додавання до корму ліпосомального препарату мікроелементів за 14 діб до запліднення, а також додатковому введенні кролицям 2-ої дослідної групи ліпосомального препарату за осіменіння, відмічено збільшення кількості жовтих тіл вагітності в яєчниках, вірогідно вища кількість місць імплантацій ( $p < 0,01$ ) та живих ембріонів ( $p < 0,001$ ) у порівнянні до контрольної групи.

Таблиця 3.76.

**Морфологічні дослідження репродуктивних органів кролематок за різних способів застосування комплексного препарату,  $n=5$ ;  $M \pm m$**

Показник	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
Кількість жовтих тіл на однусамку	$10,4 \pm 0,67$	$11,0 \pm 0,45$	$11,4 \pm 0,40$
Кількість місць імплантацій	$9,4 \pm 0,40$	$10,6 \pm 0,74$	$11,0 \pm 0,37^*$
Кількість живих плодів	$8,6 \pm 0,40$	$9,8 \pm 0,49$	$10,4 \pm 0,24^{**}$
Кількість місць резорбцій	$0,4 \pm 0,24$	$0,2 \pm 0,18$	$0,2 \pm 0,18$
Доімплантаційна летальність, %	13,46	9,09	7,01
Постімплантаційна летальність, %	4,44	2,0	1,89
Загальна ембріональна смертність, %	17,31	10,91	8,77

У кролиць обох дослідних груп встановлено у 1,5 та 1,9 раза нижчий відсоток доімплантаційної загибелі плодів відповідно до показника контрольної групи, що, ймовірно, пов'язано з тривалим позитивним впливом додаткового згодовування ліпосомального препарату. Проведенні дослідження також виявили, що відсоток постімплантаційної загибелі плодів в обох дослідних групах був у 2 рази нижчим, ніж у контролі. Так, у 1-ій дослідній групі постімплантаційна летальність становила 2,0 % та 1,89% у 2-ій дослідній групі, тоді як у контрольній групі цей показник був на рівні 4,44%. Показник загальної ембріональної смертності плодів у 1-ій та 2-ій дослідних групах знижувався у порівнянні до контролю, в основному, за рахунок доімплантаційної летальності (контроль – 17,31 %; 1-ша група – 10,91 %, 2-га група – 8,977 %).

Вагітність супроводжується змінами різних біохімічних, морфологічних та імунологічних показників крові і тканин. Найбільш повно та адекватніше відображають стан обмінних процесів в організмі показники крові [197]. Ензимна активність крові є важливим показником функціонального стану печінки, нирок, серця та інтенсивності протікання процесів обміну речовин в організмі. Тому було проаналізовано вплив згодовування ліпосомального препарату органічних мікроелементів на біохімічні показники сироватки крові кролематок (табл. 3.77). Активність печінки характеризують такі показники, як АлАТ та ГГТ. АсАТ каталізує зворотнє перенесення аміногрупи з аспарагінової кислоти на альфа-кетоглутарову, при якому утворюються глутамінова і щавелевооцтова кислоти [41]; АлАТ забезпечує переамінування в реакціях з участю аланіну, альфа-кетоглутарової, глутамінової та піровиноградної кислот [37]. Як показали проведені нами дослідження, згодовування ліпосомального препарату органічних мікроелементів спричинило зниження активності амінотрансфераз у крові кролематок дослідних груп, проте вірогідну різницю було отримано лише у 2-ій дослідній групі ще за додаткового введення ліпосомального препарату щодо активності АлАТ ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 3.77.

**Активність ензимів у сироватці крові кролиць за різних способів  
застосування комплексного препарату, n=5; M±m**

Показники	Група		
	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
АлАТ, ІО/л	48,46±1,68	46,74±2,39	43,02±1,06*
АсАТ, ІО/л	53,78±3,38	50,28±2,70	48,44±4,39
Коефіцієнт де Рітиса	1,11	1,08	1,13
ЛФ, ІО/л	1,13	135,06±11,96	90,5±6,25*
ЛДГ, ІО/л	573,48±20,76	766,02±56,72*	766,02±56,72*
ГГТ, ІО/л	8,76±0,26	10,66±0,42**	9,36±0,77

Коефіцієнт де Рітиса у крові самиць контрольної та дослідних груп суттєво не відрізнявся і залишався у межах встановленої норми, що вказує на відсутність в організмі кролиць істотних функціональних порушень.

Додавання ліпосомального препарату сприяло підвищенню активності  $\gamma$ -ГТФ у крові кролиць дослідних груп порівняно з показником контрольної групи, проте вірогідна різниця була отримана лише у 1-ій дослідній групі ( $p<0,01$ ). Отже, зниження активності ензимів переамінування за дії препарату вказує на нормалізацію метаболічних процесів в організмі кролематок у період раннього ембріонального розвитку.

Лужна фосфатаза (ЛФ) каталізує відщеплення фосфатної групи з органічних моноефірів ортофосфорної кислоти [113]. Її активність вказує на інтенсивність процесів дефосфорилування гексоз та інших фосфоровмісних сполук у тканинах [37, 260], засвоєння Кальцію та Фосфору в організмі, стан печінки та жовчних протоків. У результаті проведених досліджень встановлено вірогідне зниження активності ЛФ ( $p<0,05$ ) у 2-ій дослідній групі, кролицям упродовж 14 днів до корму вводили внутрішньом'язово при осіменінні ліпосомальний препарат мікроелементів. Зниження активності ЛФ за вагітності

зумовлене підвищеною потребою в Кальції для формування скелету плодів, а також додатковим синтезом плацентарного ізоферменту в другій половині вагітності. Вища активність ЛФ у 1-ій дослідній групі, на нашу думка, може бути спричинена достатнім надходженням до раціону кролематок Цинку, оскільки Цинк є активним центром ензиму, тоді як показники запліднюючої здатності цієї групи були дещо нижчими у порівнянні з другою дослідною групою.

Аналіз отриманих даних показав, що активність ЛДГ цинковмісного ензиму анаеробного гліколізу, у сироватці крові кролиць дослідних груп зростав. Так, у кролематок 1-ої дослідної групи активність ЛДГ була вища за показник контролю –  $766,02 \pm 56,72$  ІО/л ( $p < 0,05$ ) і становила відповідно  $573,48 \pm 20,76$  ІО/л. Застосування препарату також викликало тенденцію до збільшення у крові ЛДГ у 2-ій групі стосовно контрольної групи. Підвищена активність ЛДГ вказує на активацію гліколітичних процесів та характеризує енергетичний статус організму тварин [572].

Важливими показниками інтенсивності обміну речовин в організмі тварин є вміст у крові глюкози (вуглеводний обмін), загального протеїну та сечовини (протеїновий обмін). Під час вагітності зниження загального вмісту протеїну в крові зумовлено перерозподілом протеїну, внаслідок затримки рідини в організмі та посиленому його використанні в біосинтетичних процесах. У результаті наших досліджень не виявлено вірогідних різниць у вмісті загального протеїну, сечовини та глюкози між контрольною та дослідними групами (табл. 3.78). Зміни рівня глюкози крові пов'язані з гормональною діяльністю плаценти (секреція кортизолу та плацентарного лактогену) і синтезом інсуліну, а також активуванням гліколізу внаслідок розвитку плодів. За вагітності, у зв'язку з підвищенням енергоємних біосинтетичних процесів, значно підвищується вуглеводний обмін. Підвищення вмісту сечовини зумовлене додатковим надходженням глютамінової кислоти з ліпосомального препарату, яка є центральним метаболітом азотистого обміну [15].

Таблиця 3.78.

**Біохімічні показники сироватки крові кролиць за різних способів застосування комплексного препарату, n=5; M±m**

Група	Сечовина, ммоль/л	Глюкоза, ммоль/л	Загальний протеїн, г/л
Контроль	8,56±0,29	4,83±0,25	57,46±1,30
Дослідна 1	9,36±0,30	4,69±0,21	57,6±0,67
Дослідна 2	8,72±0,15	4,63±0,21	53,32±0,85

За даними ліпідограми, встановлено вірогідно вищий рівень загального холестеролу у сироватці крові кролиць 2-ої дослідної групи, яким за 14 діб до осіменіння додатково до корму вводили ліпосомальний препарат мікроелементів та препарат при заплідненні стосовно до показника контрольної групи (табл. 3.79).

Таблиця 3.79.

**Показники вмісту ліпідів у сироватці крові кролиць за впливу ліпосомальних препаратів органічних мікроелементів до- та при осіменінні, ммоль/л (n=5; M±m)**

Показник ліпідного обміну	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
ХС	1,33±0,12	1,59±0,12	1,81±0,13*
ЛПВЩ	0,83±0,06	1,09±0,14	1,19±0,12*
ЛПНЩ	0,93 ±0,15	1,34±0,04*	1,13 ±0,12
ТГ	1,33±0,12	1,45±0,08	1,79±0,13*

Вміст загального холестеролу в кролиць 1-ої дослідної групи також дещо зростав, проте вірогідних змін у порівнянні до контролю не відмічено. Концентрація триацилгліцеролів та ХС, ЛПНЩ і ЛПВЩ вірогідно зростала у сироватці крові кролиць другої дослідної групи порівняно до контролю, тоді

як вміст ТГ та ЛПВЩ у кролиць 2-ої дослідної групи був наближеним до контрольних значень. Зміни вмісту ліпідних фракцій крові кролиць зумовлене активацією метаболічних процесів як для синтезу стероїдних гормонів, так і для забезпечення енергетичних потреб для підготовки матки до імплантації і розвитку ембріонів.

Комплексна оцінка отриманих результатів досліджень показала, що додавання до корму ліпосомального препарату органічних форм мікроелементів до осіменіння (1-а дослідна група) та додаткове введення ліпосомального препарату (2-а дослідна група) за осіменіння кролиць знижує інтенсивність ліпопероксидації у репродуктивних органах кролиць. Посилюються окисні процеси, відбувається підвищена утилізація холестеролу в надниркових залозах, плаценті для синтезу стероїдних гормонів. Це призводить до компенсаторної транзиторної гіперхолестеринемії. У крові збільшується вміст загального холестеролу, ЛПНЩ.

Загальновідомо, що в мембранах клітин та інших біологічних системах постійно відбувається процес перокисного окиснення ліпідів (ПОЛ), а за вагітності ці процеси посилюються [144]. Накопичення продуктів ПОЛ є компенсаторною реакцією, спрямованою на забезпечення метаболічної адаптації і нормального перебігу обміну речовин в організмі вагітних.

З наведених у таблиці 3.80 результатів видно, що вміст дієнових кон'югатів у матці кролиць першої та другої дослідних груп істотно не відрізнявся від показника контрольної групи. Вміст гідроперекисів ліпідів у тканині матки самок кролів 1-ої дослідної групи був вірогідно вищим ( $p < 0,01$ ) у порівнянні до показників контрольної та 2-ої дослідних груп. При цьому концентрація ТБК-активних продуктів, які є кінцевими продуктами перекисного окиснення ліпідів, у матці кролиць 1-ої ( $p < 0,001$ ) та 2-ої ( $p < 0,01$ ) дослідних груп був вірогідно меншим, ніж у кролиць контрольної групи.

Таблиця 3.80.

**Зміни показників ПОЛ у тканині матки кролиць за різних способів застосування комплексного препарату, n=5; M±m**

Показники	Групи		
	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
ГПЛ, ум. од./мл	0,54±0,03	0,64±0,02**	0,57±0,01
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/г протеїну	1,26±0,02	0,93±0,03***	1,10±0,05**
Дієнові кон'югати, нмоль/г протеїну	0,88±0,04	0,82±0,02	0,84±0,03

Дієнові кон'югати є первинними продуктами перокисного окиснення, вони відносяться до токсичних метаболітів, які ушкоджують ліпопротеїни, протеїни, ензими та нуклеїнові кислоти [224]. Встановлено, що за умов застосування ліпосомальних препаратів мікроелементів концентрація дієнових кон'югатів у тканині яєчників кролиць дослідних груп знижується у порівнянні з контролем (табл. 3.81).

Таблиця 3.81.

**Зміни показників ПОЛ у тканині яєчників кролиць за різних способів застосування комплексного препарату, n=5; M±m**

Група	ТБК-активні продукти, нмоль МДА/г протеїну	Дієнові кон'югати, нмоль/г протеїну	ГПЛ, ум.од./г протеїну
Контроль	0,42±0,03	1,84±0,05	0,42±0,024
Дослідна 1	0,52±0,02*	1,70±0,07	0,37±0,015
Дослідна 2	0,37±0,03	1,51±0,06**	0,32±0,025*

Отримані результати вказують на інгібувальний вплив досліджуваної добавки мікроелементів на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів, а додаткове введення ліпосомального препарату, поряд з тривалим його згодовуванням, проявляє більш суттєвий (2-а дослідна група,  $p < 0,01$ ) вплив вже на початковій стадії перекисного окиснення ліпідів в організмі кролиць у період імплантації. Малоновий діальдегід (МДА) є кінцевим продуктом ПОЛ, що утворюється в організмі при деградації поліненасичених жирів під дією АФК. Накопичення МДА вказує на інтенсивність оксидативного стресу і є речовиною з високим ступенем цитотоксичності [101, 132, 202].

У 2-ій дослідній групі за сумісного додавання до корму та введенні ліпосомального препарату спостерігалась тенденція до зниження активності, утворення ТБК-активних продуктів у тканині яєчників відносно контролю. Тоді як у 1-ій дослідній групі їх вміст вірогідно підвищувався порівняно з показником контрольної групи.

Отримані результати свідчать, що тривале додавання до корму ліпосомальних препаратів мікроелементів та введення препарату за осіменіння знижує інтенсивність утворення вторинних продуктів пероксидації ліпідів, посилює систему антиоксидантного захисту організму та запобігає утворенню наступних стадій окиснення ліпідів за вільнорадикальним механізмом. Стабілізувальний вплив ліпосомального препарату органічних сполук мікроелементів зумовлений вмістом у його складі цинку та мангану, які зменшують утворення продуктів ПОЛ за рахунок активування антиоксидантних ензимів.

Отримані результати щодо динаміки утворення продуктів пероксидації носить закономірний характер за вагітності та періоду імплантації, що співпадає з інтенсифікацією процесів ліполізу в репродуктивних органах самок, коли проходить утворення вільних жирних кислот, гліцеролу, синтез статевих гормонів.

Динаміка вільнорадикальних процесів у кролиць пов'язана з окиснювальним метаболізмом у період сукрільності самок, який



супроводжується інтенсифікацією ПОЛ і збільшенням активності ензимів антиоксидативного захисту на тлі посилення функціонування антиоксидантної системи організму.

Антиоксидантна система складається з ензимної ланки, яка відповідає за знешкодження вільних радикалів та АФО і неензимної ланки, до якої належать низькомолекулярні речовини, що діють на стадіях розгалуження й обриву ланцюгів [12].

За вагітності внаслідок посилення процесів ПОЛ утворюються та накопичуються різні форми активних кисневих метаболітів, які за високих концентрацій можуть модифікувати макромолекули і призводити до деструктивних змін у клітині, порушення її структури, молекулярних механізмів клітинного пошкодження [144]. Ефективність ензимної ланки забезпечує збереження рівноваги між процесами ПОЛ та системою АОС, підтримуючи прооксидантно-антиоксидантний баланс в організмі та є одним з основних показників гомеостазу [8, 195].

Оцінювання впливу ліпосомального препарату органічних форм мікроелементів на АОС організму кролиць за вагітності проводили за активністю основних ензимів антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази (СОД) та каталази (КТ) у матці самиць. Введення кролицям ліпосомального препарату призвело до активації АОС.

Встановлено, що активність каталази у тканинах матки та яйцепроводах кролиць обох дослідних груп зросла ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ) порівняно з показником контрольної групи ( $p < 0,01$ – $< 0,05$ ) (табл. 3.82; 3.83).

З наведених у таблицях 3.82 та 3.83 даних видно, що активність СОД у гомогенаті матки та тканинах яєчника кролиць 1-ої дослідної групи була вірогідно вищою ( $p < 0,01$ ) за показник контрольної групи, тоді як рівень ензиму у 2-ій дослідній групі знаходився на рівні контрольних величин.

Таблиця 3.82.

**Активність ферментів антиоксидантного захисту у тканині матки кролиць за різних способів застосування комплексного препарату, n=5; M±m**

Показник	Група		
	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
Каталаза, ммоль/мг протеїну за хв	24,23±0,74	28,67±0,61**	26,43±0,55*
СОД, ум.од./мг протеїну	5,75±0,135	6,26±0,06**	5,61±0,08

Позитивний вплив ліпосомального препарату на процеси ПОЛ в організмі кролиць можна пояснити впливом органічних сполук мікроелементів, які входять до складу препарату, на активність основних ензимів АОС. На думку Майкл Дейлі, певну роль у захисті можуть відігравати йони мангану, які здатні послабляти окислювальний стрес шляхом знешкодження супероксидрадикала [161, 346].

Таблиця 3.83.

**Активність ферментів антиоксидантного захисту у тканині яєчників та яйцепроводів кролиць за різних способів застосування комплексного препарату, n=5; M±m**

Група	КТ, мкмоль/ мг протеїну за хв	СОД, ум.од./мг протеїну
<b>Яєчники</b>		
Контроль	8,29±0,44	7,03±0,302
Дослідна 1	10,49±0,56**	9,24±0,35**
Дослідна 2	9,37±0,46	6,99±0,13
<b>Яйцепроводи</b>		
Контроль	3,074±0,21	6,57±0,23
Дослідна 1	4,706±0,29**	6,81±0,19
Дослідна 2	4,014±0,30*	5,91±0,08*

Про що вказують вищі, порівняно з контролем, активності каталази ( $p<0,01$ ) та СОД ( $p<0,01$ ) у матці, яєчниках та яйцепроводах кролематок 1-ої дослідної групи, а також каталази ( $p<0,01$ ) у матці та СОД ( $p<0,05$ ) і каталази ( $p<0,05$ ) у яйцепроводах кролиць 2-ої дослідної групи. Присутність Мангану та Цинку в складі досліджуваного ліпосомального препарату, очевидно, зумовлювала вищу СОД активність в репродуктивних органах кролиць, адже відомо, що ці мікроелементи необхідні для прояву функціональної активності ензиму [518]. Підвищення активності антиоксидантних ензимів за дії ліпосомального препарату органічних форм мікроелементів викликало зниження оксидативного стресу, запобігало інтенсифікації вільнорадикальних процесів, що відповідно сприяло балансу про- і антиоксидантної рівноваги в оптимальних межах в організмі кролиць у ранній період суцільності.

Оскільки у печінці інтенсивно відбуваються метаболічні процеси, вона є обґрунтованим об'єктом для визначення активності ензимів антиоксидантного захисту та інтенсивності окисних процесів за дії досліджуваних препаратів (табл. 3.84).

*Таблиця 3.84.*

**Уміст продуктів ОМП у тканині печінки кролиць за різних способів застосування комплексного препарату, нмоль/мг протеїну,  $n=5$ ;  $M\pm m$**

Група	ОМП <sub>370</sub>	ОМП <sub>430</sub>
Контроль	12,14 $\pm$ 1,19	10,84 $\pm$ 1,21
Дослідна 1	6,55 $\pm$ 0,95**	5,67 $\pm$ 0,86**
Дослідна 2	8,94 $\pm$ 1,59	5,43 $\pm$ 1,12*

Встановлено, що зниження інтенсивності як окисної модифікації ліпідів, так і протеїнів, що виражалось зменшенням вмісту кінцевих продуктів окиснення. Вважається, що будь-який вплив перекисів та вільних радикалів

призводить також до складних модифікацій у білкових структурах клітини, що дозволяє розглядати ініціацію окисної модифікації протеїнів (ОМП) як один з надійних маркерів окислювальних пошкоджень клітин, оскільки похідні ОМП є більш стабільними [366]. Так, у тварин 1-ої дослідної групи спостерігали вірогідне ( $p<0,01$ ) зниження вмісту в печінці альдегідних і кетонних похідних ОМП порівняно із показниками тварин контрольної групи.

Таку ж тенденцію відзначили й у концентрації ТБК-активних продуктів та ДК у печінці тварин дослідних груп (табл. 3.85).

*Таблиця 3.85.*

**Зміни показників ПОЛ у тканині печінки кролиць за різних способів застосування комплексного препарату,  $n=5$ ;  $M\pm m$**

Група	ТБК-активні продукти, нмоль/г протеїну	Дієнові кон'югати, нмоль/г протеїну	ГПЛ, ум. од./г протеїну
Контроль	17,13 $\pm$ 0,80	1,58 $\pm$ 0,11	0,61 $\pm$ 0,01
Дослідна 1	16,72 $\pm$ 0,77	1,24 $\pm$ 0,13	0,54 $\pm$ 0,01**
Дослідна 2	16,56 $\pm$ 1,32	1,43 $\pm$ 0,14	0,59 $\pm$ 0,01

Вміст ГПЛ у тканині печінки тварин 1-ої дослідної групи вірогідно знижувався ( $p<0,01$ ), тоді як у 2-ій дослідній групі цей показник знаходився на рівні контрольних величин.

Активність КТ та СОД у печінці кролиць обох дослідних груп зростала порівняно з аналогічним показником контрольних тварин, проте вірогідних відмінностей відмічено не виявлено (табл. 3.86).

Відповідно таке зниження інтенсивності окисних процесів могло зумовлюватись включенням захисних антиоксидантних механізмів, і як наслідок, підвищення активності антиоксидантних ензимів. Проте це

підвищення не було значним, що свідчить про відсутність значного напруження та виснаження антиоксидантних ензимів.

Таблиця 3.86.

**Активність ензимів антиоксидантного захисту у тканині печінки кролиць за різних способів застосування комплексного препарату, n=5;  $M \pm m$**

Група	КТ, мкмоль/ мг протеїну за хв	СОД, ум.од./мг протеїну
Контроль	2,55±0,29	5,72±0,22
Дослідна 1	2,68±0,42	6,31±0,26
Дослідна 2	2,75±0,26	5,82±0,26

У результаті проведених досліджень встановлено, що вміст ТБК-активних продуктів у крові кролиць обох дослідних груп був вірогідно нижчим, ніж у крові тварин контрольної групи (табл. 3.87), що вказує на позитивний вплив досліджуваних ліпосомальних препаратів на нормалізацію окисних процесів та запобігання інтенсифікації ПОЛ за суцільності кролиць.

Таблиця 3.87.

**Зміни показників ПОЛ у крові кролиць за різних способів застосування комплексного препарату, n=5;  $M \pm m$**

Група	ТБК-активні продукти, нмоль /мл	ОМП <sub>370</sub> , нмоль/мг протеїну	ОМП <sub>430</sub> , нмоль/мг протеїну
Контроль	2,64±0,06	31,27±1,43	21,29±0,49
Дослідна 1	1,64±0,05**	16,45±1,98***	17,56±2,41
Дослідна 2	1,84±0,04**	16,02±2,39***	17,67±2,34

Надмірне утворення активних форм кисню (АФК) за вагітності може індукувати також і зміни у протеїнових структурах клітини. Ініціація ОМП є найбільш небезпечною ланкою ушкодження клітин, яка зумовлює інактивацію цитоплазматичних ензимів та мембранних іонних pomp [4]. При дослідженні вмісту похідних ОМП у крові кролиць встановлено зниження вмісту як альдегідних, так і кетонів похідних окисної модифікації протеїнів у обох дослідних групах порівняно з показниками тварин контрольної групи. У крові тварин 1-ої та 2-ої дослідних груп відзначене вірогідне ( $p < 0,001$ ) зниження альдегідних похідних окислювальної модифікації протеїнів – ОМП<sub>370</sub>.

Активність КТ була дещо нижчою у крові кролиць 2-ої дослідної групи, тоді як активність ензиму в тварин 1-ої групи була вірогідно нижчою порівняно з її рівнем у крові тварин контрольної групи (табл. 3.88). Ймовірно, незначне зниження активності ензиму пов'язане з його участю в інактивації окисних процесів, що провокують зниження вмісту продуктів ПОЛ та похідних ОМП.

Таблиця 3.88.

**Активність ензимів антиоксидантного захисту у крові кролиць за різних способів застосування комплексного препарату,  $n=5$ ;  $M \pm m$**

Група	КТ, мкмоль/ мг протеїну за хв	Церулоплазмін, мг/мл
Контроль	$1,59 \pm 0,08$	$28,53 \pm 2,01$
Дослідна 1	$0,77 \pm 0,18^{**}$	$30,98 \pm 4,73$
Дослідна 2	$1,37 \pm 0,21$	$43,76 \pm 6,70$

Відомо, що у функціонуванні АОЗ важливу роль відіграє церулоплазмін як основний антиоксидант плазми, який володіє вираженою оксидативною активністю, інактивує активні форми кисню, запобігаючи ПОЛ у мембрані клітин [365]. Встановлено, що у крові дослідних тварин активність ЦП зростала порівняно до показника контрольної групи, що вказує на активацію цієї ланки

антиоксидантного захисту у відповідь на застосування ліпосомальних препаратів. Введення до складу гранульованого комбікорму ліпосомального препарату “Ліпоорганік” та згодовування його кролематкам до осіменіння та ін’єкції ліпосомального препарату при осіменінні позитивно впливають на систему антиоксидантного захисту, викликає підвищення інтенсивності ліпідного обміну, що приводить до активування гормональної перебудови організму кролиць у період сукрільності та забезпечує оптимальні умови для імплантації та розвитку плодів.

Отже, дослідження виявили, що застосування розробленого комплексного ліпосомального препарату “Ліпоорганік”, збагаченого органічними мікроелементами, зумовлює регуляторний вплив на окремі ланки метаболізму в організмі кролиць у передімплантаційний та ранній період сукрільності. Важливе значення має також введення до складу препарату органічних сполук Мангану, Цинку і Хрому у ліпосомальній формі, що забезпечує здатність складових препарату до пролонгованого впливу за підшкірного введення внаслідок створення депо й поступовим тривалим надходженням у кров, що сприяє корекції обмінних процесів в репродуктивних органах самок, підвищує відтворювальну функцію та збільшує приживлювальність ембріонів. Біологічна дія препарату також ґрунтується на впливі глютамінової кислоти, яка бере активну участь в енергетичних та пластичних обмінних процесах, що дозволяє їй за зміни функціонального стану тканин та органів, зокрема при вагітності, включатися у метаболічні перетворення, а також стимулювати гіпоталамо-гіпофізарну систему.

Використання препарату “Ліпоорганік” стимулює відтворювальну здатність самиць, сприяє підвищенню морфо-функціонального стану яєчників, збільшує число жовтих тіл вагітності та кількість живих плодів за рахунок зниження до- та постімплантаційної смертності, що призводить до зростання кількості імплантацій ембріонів. Одним з компенсаторних механізмів є гемодилуція, яка включає зміни об’єму циркулюючої крові за рахунок приросту

її компонентів - плазми та еритроцитів. Підтримання відповідності між ємністю новоутвореного судинного русла і масою циркулюючої крові пов'язано з особливостями нейрогуморальної регуляції та за рахунок змін у системі водно-електролітного і протеїнового балансу.

Зміна об'єму циркулюючої крові (ОЦК) і кровопостачання нирок призводить до змін видільної функції нирок. Рівень сечовини у сироватці крові кролиць дослідних груп дещо підвищувався, хоча вірогідної різниці між показником контрольної групи не встановлено. У гестаційний період починаються процеси адаптації та перебудови систем регуляції, посилюється обмін речовин з переважанням катаболічних процесів в тканинах. Підвищення рівня ЛДГ у кролиць за дії ліпосомального препарату можна розглядати як компенсаторну реакцію організму за умов адаптації організму в ранній період сукрільності, що спрямована на активування обмінних процесів, зниження спорідненості гемоглобіну до кисню, збільшення ступеня дисоціації оксигемоглобіну, що призводить до полегшення переходу кисню у клітини.

Оскільки посилюються обмінні процеси в організмі, то істотно змінюється за вагітності й ліпідний обмін. За даними ліпідограми, встановлено вірогідно вищий рівень ЗХ ( $p < 0,05$ ), концентрація ТГ ( $p < 0,05$ ) та вміст ЛПВЩ ( $p < 0,05$ ) у сироватці крові кролиць дослідних груп, що спрямовано на забезпечення енергетичних і пластичних процесів, синтезу стероїдних гормонів та створення оптимальних умов для розвитку плодів. Препарат також позитивно впливає на рівень антиоксидантів в організмі кролиць при сукрільності, що особливо є важливим, оскільки на великих кролефермах при використанні інтенсивного способу вирощування кролів практикується поєднання сукрільності з лактацією, що призводить до напруження системи АОЗ внаслідок нездатності організму за короткий час повністю відновитися й подолати оксидативний стрес.

Результати досліджень опубліковано у науковий працях [169, 206, 217, 228, 253, 254, 260, 265, 591, 592, 593, 594, 595, 597, 599, 600, 602, 604].



## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розвиток біотехнологічних методів відтворення у тваринництві, зокрема культивування ооцитів та ембріонів *in vitro*, запліднення поза організмом, кріоконсервування гамет, отримання трансгенних тварин, забезпечує збільшення кількості нащадків з бажаними ознаками, цінних генотипів і видів тварин. Стрімкий розвиток біотехнології і молекулярної генетики відкриває нові можливості для створення нових порід тварин за допомогою трансгенезу [24, 65, 66, 210].

Мікроін'єкція плазмідних генно-інженерних конструкцій у пронулекуси зигот є основним методом отримання трансгенних тварин. Однак, застосування методу пронуклеарної мікроін'єкції ДНК-конструкцій у дослідницьких лабораторіях та ефективність переносу генів залишається досить низькою, що обмежує використання цього методу для отримання трансгенних сільсько-господарських тварин. За статистикою одну трансгенну тварину вдається одержати з 40 ін'єкованих зигот миші, чи з 100 зигот вівці або кози, чи з 1500 зигот корови. Однією з причин, що стримує застосування трансгенних технологій є низька частота інтеграції рекомбінантних генів у геном тварин-реципієнтів, механізм якої до кінця не з'ясовано [124, 410]. У мишей ефективність трансгенезу складає у середньому 15%, у свиней — 10-15%, у кроликів — 10%, в овець, кіз, свиней і корів — 0,5 % [78], а генетична інтеграція, зокрема, у мишей не перевищує 15% [65]. Відсоток зигот, які здатні розвиватися після мікроін'єкції не перевищує 10-30%, а хромосомна інтеграція трансгена у ін'єкованих зиготах мишей становить 10-40% [391]. Одним із характерних показників є загальна ефективність трансгенезу, що розраховується як співвідношення (у відсотках) кількості отриманих трансгенних тварин до загальної кількості пересаджених ембріонів. Загальна ефективність трансгенезу у мишей становить 2%, у кролів — 1%, у кіз та овець — 0,5-1%, у свиней та ВРХ — 0,5 % [312, 410]. Основна суть і мета

транспегенезу – отримання стійкої інтеграції та експресії транспгена в геномі реципієнта (зиготи) зі стійкими заданими ознаками у ряді поколінь нащадків.

Процедура виконання транспгенних мікроін'єкцій є технічно вимогливою, а результативність залежить від методичних підходів, які лежать у технічній та біологічній площині [286, 354], що спонукає до пошуку нових та удосконалення наявних підходів [142, 489, 524]. Метою наших досліджень було вивчити вплив різної концентрації екзогенної модифікованої форми лінійної ДНК для мікроін'єкції у пронуклеус зиготи миші. Результати досліджень відображають основні показники подальшого розвитку зигот унаслідок мікроін'єкції транспгенної конструкції, що містила ген *1700094C09Rik* у концентраціях 2 і 4 нг/мкл порівняно з ін'єктованим буфером TE (позитивний контроль) та інтактними ембріонами миші (від'ємний контроль) при культивуванні *in vitro*, а також після трансплантації реципієнтам. Ген *1700094C09Rik*, відомий також як ген *LOC78634*, що кодує білок LOC78634. Зараз згідно нещодавньої роботи [451], цей ген ідентифіковано як ген *Spaca7* (Sperm acrosome associated 7).

Застосовуючи метод мікроін'єкції у пронуклеус зиготи миші було введено транспгенну конструкцію, у склад якої вбудовано ген *1700094C09Rik*. Показано її здатність інтегруватися у геном реципієнта з достатнім рівнем транспгенної експресії. Мікроін'єкція екзогенної ДНК в концентраціях 2 і 4 нг/мкл, як і введення TE буфера, знижує життєздатність зигот, однак, зменшення концентрації розчину ДНК до 2 нг/мкл зумовлює кращу здатність ембріонів миші розвиватись до стадії бластоцисти за перебування поза організмом і забезпечує кращу плацентацію ін'єктованих зигот після ембріональної трансплантації щодо ін'єкції розчину ДНК з концентрацією 4 нг/мкл ( $p < 0,05$ ). Рівень імплантації зигот після ін'єкції у пронуклеус транспгена у досліджуваних концентраціях був суттєво вищий за відсоток зигот, які досягнули стадії бластоцисти поза організмом: 36,7% та 30% за умов *in vivo* експерименту порівняно з 8,6% і 5,7% за умов *in vitro*, що доводить доцільність безпосередньої трансплантації ембріонів реципієнту.

Рівень інтеграції та ефективність трансгенезу ін'єктованих зигот, розвинутих у бластоцисти або повноцінні організми за концентрації вибраної екзогенної ДНК 2 і 4 нг/мкл *in vitro* складає 8,6% і 5,7% та *in vivo* 36,7% та 30%.

Інтенсивний розвиток репродуктивних технологій потребує забезпечення достатньою кількістю біологічного матеріалу, тому кріоконсервування репродуктивних клітин та ембріонів, їх тривале зберігання є однією з найбільш актуальних проблем сучасної біотехнології відтворення. Здатність ембріонів за низьких температур зберігати життєздатність без порушення метаболічної активності [481, 526], дозволяє широко використовувати методи кріоконсервації для довготривалого збереження зародків як генетичного матеріалу для проведення трансгенних досліджень [530, 652, 675].

Попри значні досягнення у кріоконсервуванні яйцеклітин і ембріонів ссавців [165, 330, 335, 358], досі залишаються невирішеними питання, які пов'язані з оптимізацією вже наявних методів кріоконсервування, ефективністю їх застосування для консервування ембріонів ранніх стадій розвитку, а також пошуком нових кріопротекторів. Дослідження сучасної кріобіології спрямовані на спрощення технології заморожування, скорочення часу заморожування й розморожування біоб'єктів [53, 501, 640]. Найбільш перспективним вважають вітрифікаційний метод кріоконсервування ембріонів [291, 564, 569, 575]. Цей метод успішно використовується для кріоконсервування ооцитів [186, 318, 459], тканин яєчників [553], ембріонів [53, 356] тощо.

Широке впровадження методу вітрифікації обмежується необхідністю використання високих концентрацій кріопротекторів під час екваїбрації ембріонів. Найбільш ефективним є поєднання проникаючих і непроникаючих полімерних кріопротекторів [455], що дозволяє значно знизити токсичність вітрифікаційних розчинів за рахунок зменшення концентрації проникаючих кріоконсервантів без зниження збереженості та осмотичної стійкості заморожуваних біологічних об'єктів [173], сприяє досягненню оптимальної

дегідратації клітин [333], значно спрощує процедуру заморожування і зберігання зразків [499]. До вітрифікаційних розчинів додають такі макромолекулярні сполуки, як ЕГ, ПЕГ, БСА, фікол та ПВП [333, 372, 454]. Дослідженнями Пішко О.В. встановлено, що використання ЕГ при швидкому заморожуванні 2-ох клітинних ембріонів мишей дозволяє уникнути внутрішньоклітинної кристалізації та дозволяє отримати високий рівень життєздатності зигот після розморожування [164]. Захисні властивості полімерів пов'язані з їх здатністю змінювати фізичні властивості розчинів на етапі заморожування-розморожування внаслідок структурування молекул води та зниження температури її замерзання [173], що суттєво підвищує в'язкість позаклітинного середовища, допомагає уникнути утворення позаклітинних кристалів льоду [53, 481].

Ефективність кріоконсервування передімплантаційних ембріонів залежить від стадій їх розвитку [107, 201], оскільки проникність мембран ранніх зародків істотно відрізняються від більш пізніх стадій розвитку [490]. Тому для підвищення збереженості та життєздатності ембріонів на стадії 2-х пронуклеусів при надшвидкому заморожуванні існує необхідність пошуку нових кріозахисних середовищ, режимів еквілібрації доімплантаційних зародків [291].

Результати культивування ембріонів після заморожування-відтаювання показали, що рівень розвитку деконсервованих ембріонів до стадії 2-ох клітин при використанні 28% ЕГ і 12% ДМСО був на 12,6 % вищим, ніж у вітрифікаційному середовищі тільки з 40 % ЕГ. Зниження концентрації ЕГ у середовищі для заморожування ембріонів миші методом вітрифікації, шляхом додавання еквівалентної кількості непроникаючого кріопротектора 12 % ДМСО або 5 % ПВП «пом'якшує» вплив надшвидкого охолодження на ембріони [436, 444], про що вказує високий показник збереження деконсервованих ембріонів у дослідних групах. Це, очевидно, можна пояснити тим, що у водних розчинах молекули ПВП, які мають у своєму складі гідрофільні й гідрофобні ділянки, приймають спіральну конфігурацію. У

результаті значно підвищується загальна в'язкість кріозахистного розчину, що, як вважають [520], знижує його токсичну дію на ембріон. Отже, поєднання комбінації кріопротекторів у співвідношенні 28 % ЕГ+12 % ДМСО та 35 % ЕГ+5 % ПВП у вітрифікаційному середовищі при заморожуванні ембріонів на стадії 2-х пронуклеусів знижує негативний вплив кріопротекторів, що підтверджується вищими показниками життєздатності деконсервованих ембріонів та їх здатністю до розвитку *in vitro*. Оскільки об'єктивним критерієм морфофункціональної цілісності кріоконсервованих ембріонів є їх здатність до поновлення мітозу і подальшого дроблення *in vitro* [462].

Для покращення умов культивування передімплантаційних ембріонів *in vitro* використовують системи спів-культивування з клітинами різних типів, кумулюсу і гранульози, фолікулярною рідиною преовуляторних фолікулів [162, 490, 512]. У наших дослідженнях для підтримки та відновлення деконсервованих ембріонів використано культуральну систему клітин яйцепроводів. Для встановлення впливу ко-культивування проведено порівняння розвитку деконсервованих ембріонів *in vitro* на живильному моношарі клітин яйцепроводів та у культуральному середовищі без клітин.

Порівняння результатів досліджень 2-х експериментальних груп не виявлено значних відмінностей між рівнями розвитку ембріонів до стадій 4-ох клітин між дослідними групами за різних умов культивування. Разом з тим відзначено збільшення загального показника дроблення деконсервованих передімплантаційних ембріонів *in vitro* до пізніх стадій при дозріванні у культуральному середовищі з клітинами яйцепроводів, порівняно із групою деконсервованих ембріонів, які культивувалися без клітин яйцепроводів.

Оскільки ранні зиготи і зиготи на стадії, яка передує мітозу, найбільш чутливі до дії шкідливих факторів кріоконсервування, отримані результати досліджень вказують на перспективність використання за кріоконсервування ембріонів мишей на стадії двох пронуклеусів методом надшвидкої

твердоповерхневої вітрифікації мікрокрапель 35 % ЕГ та 12 % ДМСО та живильного моношару клітин яйцепроводів для відновлення дроблення деконсервованих ембріонів.

Культитивування ранніх ембріонів *in vitro* є важливою складовою біотехнологічних досліджень, зокрема, при заплідненні поза організмом, клонуванні та отриманні трансгенних тварин [295, 440]. В останні роки інтенсивно розвиваються дослідження з вивчення клітинної сигналізації, проліферативного росту та міграції клітин у 3D культурі [11, 368, 434, 634, 672] з використанням об'ємних клітинних культур на основі різних речовин (фібрин, водорості, синтетичні пептиди, нанорешітка з діоксиду титану тощо [292, 364, 445].

Одним із головних завдань клітинної біотехнології є вибір адекватного носія для клітин, оскільки тривале культивування клітин на носії-підкладці впливає на функціональну активність, проліферативну здатність та диференціацію, гістогенетичні властивості клітин. Клітини, які ростуть на об'ємних матриксах значно різняться за морфологією та ступенем диференціації. За таких умов взаємодії між клітиною і клітиною (*cell-to-cell*) та матриксом є більш наближені до умов *in vivo* [281, 364, 417].

Серед біоматеріалів, які використовують у біотехнології та активно вивчають для конструювання матриксів клітин, є як природні компоненти – колаген, алгінат (отримують з водоростей), фібрин, хітозан, клітини сполучної тканини (кератиноцити) [292, 677], так і синтетичні матеріали – модифіковані форми гіалуронової кислоти, поліетиленгліколь, поліаміди, силікон, поліетилентерефталат, полімери гліколевої та молочної кислот, а також новий клас полімерів [309, 445, 516, 620]. Сьогодні використовують кілька типів полімерних наношарів на твердих поверхнях [297]. Виділяють наношари, сформовані на основі вуглеводів, зокрема декстрану та целюлози, що здатні контрольовано адсорбувати білки гепарину та гепариноподібних сполук [314] та інгібувати процес коагуляції крові.

Заслужують уваги синтетичні полімери на основі амінокислот. Включення амінокислотних залишків у синтетичні полімери дозволяє створити нові небіологічні макромолекули з біоімітуючими структурою та властивостями, що здатні утворювати самовпорядковувані структури, біосенсорні системи та біосумісні матеріали [521].

Майже усі методи формування біологічно активних наночарів зводяться до формування адсорбційних протеїнових наночарів [555]. Закономірності формування стабільних протеїнових адсорбційних наночарів тісно пов'язані з такими факторами, як природа протеїну та поверхні, рН-буферного розчину та його йонна сила, температура тощо. Водночас біологічні властивості протеїнових наночарів відносно нестабільні та легко руйнуються при зміні конформації чи структури протеїнових макромолекул. Особливо актуальними та перспективними методами модифікації твердих поверхонь є прищеплення біологічно активних пептидів (RGD-пептиди) [305]. Вони поступаються місцями контакту з клітинами та впливають на їх ріст та розвиток [552]. Показано, що прищеплення лізину до поверхні поліакрилонітрильних фільтрувальних мембран значно понизило їх здатність до адсорбції БСА та лізоциму [374, 387, 585]. Формування прищеплених наночарів поля (N-метакрилоїл валіну) на поверхні силіконових пластин значно підвищує ефективність проліферації клітин порівняно з вихідною поверхнею.

Проведені скринінгові дослідження наноповерхонь на стандартизованих клітинних лініях та первинних культурах клітин показали, що поверхні скла, модифіковані наночарами АПТЕС, декстрану, альбуміну та полі(N-метакрилоїл-L-лейцину) не виявляють токсичних властивостей та можуть бути використані для культивування різних типів клітин. Порівнюючи дані проліферації клітин лінії NIH3T3 на поверхнях з різноманітними модифікаціями скла відмічено суттєве підвищення росту ембріональних фібробластів у групі, клітини якої культивували на поверхні АПТЕС+декстран. Модифіковані поверхні скло+АПТЕС+альбумін та

шкло+АПТЕС+декстран сприяють підвищенню проліферативної активності та життєздатності клітин лінії NIH3T3, посиленню адгезії клітин та їх функціональній здатності і можуть бути використані для конструювання клітинних матриксів для вирощування клітин маткового походження для культивування ооцитів та ембріонів. Виражений вплив на проліферативну активність, життєздатність та проліферативний індекс клітин яйцепроводів та ендометрію має покриття скляної поверхні АПТЕС, а комплекс АПТЕС разом із декстраном.

Для створення об'ємних культуральних систем за використання природних компонентів як носії використано курячий овальбумін, який володіє високою адгезивною здатністю [464] та багатий на біоактивні речовини [396], що дозволяє підтримати ріст і розвиток клітин [435]. Порівнянням адгезивних здатностей матриці з біогелю природнього походження та нанопокриття з альбуміном, нанесеного на скельця методом органічного синтезу, на культурі ембріональних фібробластів лінії NIH3T3, клітинах яйцепроводів та ендометрію встановлено, що біогель викликає підвищення життєздатності та проліферативного індексу клітин упродовж усього періоду культивування, тоді як нанопокриття скляної поверхні альбуміном проявляє менш помітний стимулювальний вплив на проліферативну здатність клітин.

Ефективність комплексної просторово-організованої клітинної системи клітин ендометрію на біогелі та альбуміні визначали за результативністю дозрівання ооцит-кумулясних комплексів до метафази-2 та розвитком ембріонів до трансферабельних стадій. Встановлено, що культивування ОКК на біогелі без клітин підвищує на 10% дозрівання ооцитів до стадії метафази-II, а за ко-культивування на моношарі культури клітин ендометрію – на 16,7%. Стимулювальний ефект альбуміну на дозрівання ОКК не спостерігали.

Отже, синтезовані полімерні наношари покращують адгезію клітин, стимулюють їх ріст, а також володіють цитопротекторними властивостями і



можуть бути застосовані у біомедичних цілях для вирощування експериментальних клітинних ліній, розмноження клітин, отриманих від донорів, для формування мультиклітинних структур (попередників тканин та органів), а також для дорощування та культивування ооцитів та зигот поза організмом до трансферабельних стадій.

Фактори довкілля призводять до напруження адаптивних резервів організму, що зумовлює зниження відтворювальної функції, адже для більшості ксенобіотиків характерні гонадо- та ембріотоксичні властивості. Виникнення захворюваності зумовлює поєднання впливу чинників довкілля та генотипу, що визначають опірність організму та можуть призводити до цитогенетичних порушень у статевих і соматичних клітинах та бути причиною генетично зумовленої патології та вроджених вад розвитку [58, 109]. Адаптація організму до дії стресових факторів як біотичного, так і абіотичного характеру, є однією з ключових проблем фундаментальної науки, оскільки вирішення цих завдань має вагоме практичне значення у біології і медицині. Тому з'ясування причин виникнення і розвитку порушень репродуктивної функції за впливу чинників довкілля дозволить визначити межі адаптаційно-компенсаторних можливостей організму, віднайти шляхи їх посилення та розробити профілактичні заходи їх попередження.

Для досліджень впливу хлоридів кадмію, нікелю та купруму як тест-об'єкти використано ембріональні фібробласти та первинні культури клітин репродуктивних органів тварин, що дозволило виявити безпосередній вплив досліджуваних сполук на відтворювальну здатність та з'ясувати органну токсичність різних концентрацій досліджуваних сполук. Фібробласти характеризуються морфофункціональною гетерогенністю, яка формується в ембріогенезі [615], що обумовило проведення експериментальних досліджень.

За порівняння тканино-специфічного впливу солей важких металів  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$  встановлена різна чутливість досліджуваних культур

клітин: клітини ембріонального фібробласту плодів виявилися у 3-6,5 разів більш чутливими до сполук хлориду кадмію та купруму, ніж до нікелю хлориду. Кадмію та купрум хлориди проявляли виражену цитотоксичну дію на обидві культури клітин, тоді як за впливу хлориду нікелю спостерігалась значна відмінність щодо клітин яйцепроводів та ембріонального фібробласту. Меншого впливу за дії нікелю хлориду зазнали клітини яйцепроводів, активність проліферативних процесів яких, знижувалась впродовж усього періоду культивування у 1,2-1,3 разів, тоді як концентрація ембріональних фібробластів за присутності сполуки нікелю була вірогідно нижчою у порівнянні з контрольною групою ( $p < 0,001$ ) впродовж культивування. Отримані результати узгоджуються з дослідженнями інших авторів, які встановили, що діапазон токсичної концентрації нікелю хлориду, крім часу та дози експозиції сполуки, залежить від типу клітин [670]. Так, в експериментах на культурі клітин показано, що нікелю хлорид проявляє цитотоксичний ефект у дозі вищій за 0,75 мМ. Нижчі концентрації  $\text{NiCl}_2$  - 0,25-0,5 мМ викликають стримування G0/G1 фази, тоді як концентрації 0,5-2 моль призводять як до затримки клітинного циклу у фазі S і G2/M, так і до індукції апоптозу в культурі клітин [343].

За інкубації клітин з кадмію хлоридом вже на 24-ту год культивування життєздатність ембріональних фібробластів складала 19,44% та 22,79% для клітин яйцепроводів. З тривалістю інкубації життєздатність клітин знижувалася і на 72-гу год спостережень ріст клітин гальмувався до 7,26% та 7,81% відповідно. Зниження рівня проліферації клітин, зумовленої цитотоксичним впливом важких металів, супроводжується змінами метаболічних процесів. Одним з перших механізмів цитотоксичності важких металів, зокрема, Кадмію є порушення функцій мітохондрій. Підтверджено, що йони Кадмію інгібують мітохондріальні ензими, які регулюють швидкість дихання [303] та зв'язуючись з протеїновими структурами мітохондріального матриксу, зумовлюють дисфункцію субклітинних структур [129] внаслідок порушення йонного транспорту у клітині, зокрема Кальцію, що призводить до

активування каспаз-3 та 9, протеолізу білків та фрагментації ДНК [653]. У наших дослідженнях за дії кадмію хлориду у культурі ембріональних фібробластів і клітин яйцепроводів гальмується утилізації глюкози, знижується інтенсивність споживання Фосфору, активності ЛФ, рівня Кальцію, що відповідає критеріям гальмування проліферативної активності клітин [263].

Купрум хлорид у високих концентраціях (100 та 200 мкг/мл) також проявляв виразну токсичну дію стосовно обох культур клітин: ступінь виживання ембріональних фібробластів та клітин яйцепроводів на 24-ту год становив 27,56 % і 28,10 %, а на 72-гу год спостереження знижувався до 8,13% та 2,59 % відповідно. Тоді як життєздатність клітин яйцепроводів, що інкубувались з нікелу хлоридом була 86,44% і 76,92% упродовж культивування, натомість рівень виживання ембріональних фібробластів на 24, 48 та 72 год спостереження становив відповідно 61,18 %, 42,18 % та 46,87 %. При вивченні впливу Купруму *in vitro* встановлено залежність токсичності від дози та виду сполуки: доза 2 мкг/мл  $\text{CuSO}_4$  покращує ріст клітини гранульози яєчників свиней у моношарі [450], тоді як додавання 10 мкмоль/л хлориду купруму до культурального середовища вірогідно знижує розвиток ембріонів та гетчінг бластоцист [325].

Дослідженнями *in vivo* встановлено, що під час вагітності посилюється накопичення та перенесення Купруму з організму матері до плоду [348, 507], при цьому вірогідно високий вміст даного елемента у плаценті відзначено вже на початку гестаційного періоду [191]. Такий обмін проходить через ворсинки хоріону, про що вказує високий ступінь затримки Купруму в цій частині посліду ( $87,25 \pm 0,76$  мкг%) [128]. Дефіцит Купруму вдвічі знижує імплантаційну здатність зародків у матці та у 30% випадках є причиною не виношування вагітності [639]. Однак надлишкове надходження елемента під час вагітності зумовлює ембріотоксичний ефекти, що пов'язано з прямою цитотоксичною дією Купруму на репродуктивні та ембріональні клітини. Так, сульфат купруму в дозі 4,25 мг/кг викликав резорбцію 86 % зародків у

самок золотистого хом'ячка, а за дії цитрату купруму у максимально витримуваній концентрації, 34% імплантованих зародків гинули [128]. Введення 70 мг хлориду купруму на 9 добу гестації викликало зниження маси плодів і плаценти на 19-ту добу вагітності [326].

Для комплексного з'ясування механізмів цито- та органоспецифічної особливості дії сполук металів на клітинному рівні досліджено залежність росту ембріональних фібробластів корів за різного часу експозиції сполук. За короткотривалої присутності хлориду кадмію у культуральному середовищі у дозі 50 мкг/мл спостерігалось відновлення проліферації клітин на 3 та 6 год, тоді як тривала дія сполуки — 48 та 72 год викликала цитотоксичний вплив. Відновлення поділу ембріональних фібробластів після короткотривалого впливу кадмію хлориду вказує на можливість регенерації проліферативних процесів завдяки репараційних та преадаптивних структурно-функціональних можливостей клітин. Отримані дані узгоджуються з результатами інших дослідників [1, 86], в яких показана здатність невисоких концентрацій кадмій хлориду ініціювати адаптивну відповідь у клітинах людини. Іншими авторами встановлено, що малі дози кадмію хлориду не викликають значних цитогенетичних змін та проліферативної активності клітин епітелію ротової порожнини, а ензимні реплікаційні та репараційні системи зберігали високу активність, що забезпечувало захист клітин від виникнення хромосомних перебудов [1]. Механізм, що регулює обмін Кадмію, пов'язаний із низькомолекулярним білком — металотіонеїном, який містить значну кількість вільних сульфгідрильних груп [6, 16, 582]. Ймовірно, надходження Кадмію активує генетично зумовлену індукцію генів, які відповідають за продукцію окремих металотіонеїнів [288, 448].

При вивченні часової залежності впливу нікелю хлориду в концентрації 100 мкг/мл встановлено зниження росту клітин у 1,38-1,5 раза на 24 год культивування в усіх досліджуваних групах, незалежно від часу експозиції сполуки. Отримані результати узгоджуються з даними Дудченка Т. М. (2000)

[72], що одногодинна інкубація клітин з йонами Нікелю в концентрації 10 мкг/мл спричинює затримку їх в лаг-фазі та пригнічення виживання на 5-ту добу культивування до 27 % у порівнянні з контрольною групою. Значний інгібуючий вплив йонів нікелю на клітини в першу добу культивування зумовлений здатністю іонів металів контактувати з ДНК під час мітозу, коли цілість ядерної мембрани порушується, що знову-таки може спричинити утворення аберацій ДНК [327, 690]. За даними інших авторів, Нікель порушує синтез ДНК, РНК та затримує клітини в S-фазі поділу [270, 320]. Однак на 48 год спостереження у межах дослідних груп спостерігалось підвищення проліферації клітин, хоча у дослідних групах концентрація клітин була вірогідно нижчою порівняно з контролем ( $p < 0,01$ ). Найбільш суттєве відновлення росту клітин на 48-72 год культивування мало місце за короткої експозиції сполуки нікелю (3 та 6 год), що вказує на можливість зворотних процесів за дії нікелю хлориду навіть за високих доз сполуки. Такі відновлювальні властивості ембріональних фібробластів стосовно вищих експозицій нікелю хлориду – 24-48 год були менш вираженими, що вказує на пряму залежність здатності клітин до утворення моношару від тривалості впливу сполуки. Пригнічення росту культури за впливу нікель хлориду зі збереженням відновлювальної здатності підтверджено метаболічними показниками. Вміст глюкози впродовж культивування вірогідно знижувався як у дослідній групі за впливу нікелю хлориду, так і у контрольній групі, що вказує на високий рівень біосинтетичних процесів у культурі ембріональних фібробластів. Аналогічно, змінювався вміст Кальцію та Фосфору у контрольних та дослідних групах впродовж інкубування. Отримані дані узгоджуються з результатами, які за дослідження *in vitro* впливу нікелю хлориду на клітинний цикл клітин встановили, що суттєві зміни були виявлені лише після 24-годинного впливу 2мМ  $\text{NiCl}_2$ , тоді як більш короткий термін і менші концентрації не впливали на розподіл клітинного циклу [343]. Відомо, що йони  $\text{Ni}^{2+}$  стабілізують структуру нуклеїнових кислот та рибосом, однак їх надлишок викликає ушкодження ДНК, індукуючи 1- та 2-ланцюгові

розриви, формування поперечних зшивок ДНК. Такі ушкодження запускають механізми зупинки клітинного циклу та репарацію ДНК, а у разі критичних ушкоджень, активуються процеси апоптозу [653]. Отже, отримані результати досліджень підтвердили загальну цитотоксичність хлориду кадмію та купруму, тоді як хлорид нікелю проявляє селективну тканино-специфічність щодо клітин репродуктивних тканин.

Дослідження цитотоксичності купруму хлориду в культурі клітин яйцепроводів показали, що високі дози 100 та 200 мкг/мл викликали вірогідне інгібування росту клітин, що узгоджується з даними вивчення гострого токсичного ефекту купруму сульфату на мишах [289]. Однак, дія купруму хлориду в низьких концентраціях 0,001, 0,05 та 0,1 мкг/мл не викликала цитотоксичного ефекту. За концентрації 0,01 мкг/мл відзначено стимулювальний вплив купруму хлориду на епітеліальні клітини яйцепроводів. Отримані дані досліджень *in vitro* підтверджуються результатами дослідів на тваринах, де виявлено залежність репродуктивної відповіді самиць миші від дози та сполук купруму [567]. Так, негативний вплив хлориду купруму на фолікулогенез мишей спостерігався у перші два дні після інтраперитоніального введення 0,1 мл хлориду купруму, тоді як на 5 та 10 день після обробки показники нормалізувались [353]. Порівняння результатів різної експозиції хлориду купруму показали, що максимальними концентраціями, встановленими для клітин яйцепроводів корів є 0,05 та 0,1 мкг/мл.

Аналіз чисельних експериментальних даних виявив, що як недостатність, так і надлишкове надходження Купруму в організм може призводити до порушення життєво важливих функцій в організмі під час вагітності, що зумовлене складним механізмом регуляції внаслідок високої його біологічної активності. Тому в період вагітності необхідно враховувати як можливий шкідливий вплив сполук купруму на розвиток плоду, так і зростаючі під час вагітності потреби у цьому елементі [525, 567].

Загальноприйнятою є концепція, що репродуктивне здоров'я людини є інтегральним показником стану довкілля й індикатором екологічного неблагополуччя [116, 152, 174, 250]. Аналіз причин безпліддя виявив збільшення питомої ваги чоловічого фактора за останні 20 років у середньому на 10–12%. Причому до сьогодні більше ніж 30% випадків становить ідіопатична безплідність, причини яких зумовлені негативним впливом довкілля. Особливу небезпеку також складають екологічні фактори, дія яких може призводити до порушення нормальної функції репродуктивної системи чоловічого та жіночого організмів та розвитку патологічних змін [55, 168, 213, 584]. Постійна диференціація статевих клітин, які є носіями генетичної інформації та є чутливими до дії різних чинників, зумовлює важливість з'ясування молекулярних механізмів відповідних гамет на дії факторів різної природи.

Порушення викликані локальною гіпертермією залежать від температури, тривалості експозиції та типу тканини, можуть бути тимчасовими або призвести до стійкого безпліддя. Гіпертермія сім'яників середнього ступеня ( $42,0\text{--}43,1^{\circ}\text{C}$  упродовж 30 хвилин) у молодих статевозрілих щурів призводить до пригнічення сперматогенезу, однак не позначається на їх фертильності, тоді як у пізньому статевозрілому віці такий вплив призводить до безплідності через припинення сперматогенезу та неспроможності до еякуляції [180, 200]. Хронічна гіпертермія сім'яників щурів середнього ступеня упродовж 60 діб по 5 годин призводить до відшарування та некрозу пластів клітин сперматогенного епітелію [158]. При порівнянні реакції на підвищення температури інших тканин організму, зокрема клітин кісткового мозку, ендотеліальних клітин, сперматоцитів відзначена вища стійкість статевих клітин, що зумовлено різною активністю репаративних ензимів в тканинах, пов'язаних з виконанням ними відповідних функцій в організмі.

Проаналізувавши отримані результати впливу гіпертермії на експресію генів у статевих та соматичних клітинах самців мишей, встановлена

тканиноспецифічна відмінність активності вивчених генів. У тканині сім'яників мишей за теплового шоку виявлена висока активність генів *Mdm1*, *Hdac4* та *c-fos*, які залучені до регуляції клітинного циклу та диференціації статевих генів *mDaz* та *Suv39h*. Тоді як у продуктах ПЛР з печінки мишей, експресії цих генів не виявлено. Отримані відмінності, очевидно, пов'язані з гетерогенністю та фізіолого-біохімічними особливостями сім'яників.

Відомо, що сперматогенез пов'язаний з клітинною регенерацією, диференціюванням та контролюється великою кількістю генів, розміщених як на аутосомах, так і на гонадосомах (статевих хромосомах), особливо на Y-хромосомі. Основним геном, який відповідає за розвиток статевих клітин впродовж сперматогенезу, зокрема зародкових клітин самців, сперматид та сперматогоній є *DAZ* (deleted in azoospermia) [561]. Цей ген розташований на довгому плечі Y-хромосоми у локусі фактора азооспермії *AZF* та належить до ключових генів раннього сперматогенезу. Ген містить РНК-зв'язний домен, що вказує на участь генів цієї родини у трансляції мРНК та, ймовірно, у диференціюванні сперматогенних клітин та мейотичному поділі [385, 644]. Делеції гену можуть призводити до блокування сперматогенезу на стадії пахітени [226]. Мікроделеції в *AZF*-локусі є однією з найбільш частих генетичних причин важких форм порушення сперматогенезу [337]. Так, до 10-12% не обструктивної азооспермії та 8-9% важкої олігозооспермії викликані делеціями в локусі *AZF*. У переважній більшості випадків *AZF*-делеції є *de novo* мутаціями, які можуть виникати внаслідок негативного впливу екзогенних чинників.

Ще одним з генів статевих хромосом, експресія якого диференційовано змінювалась за гіпертермії є *Suv39h1*. Цей ген кодує метилтрансферазу гістона H3, метилуванням по 9-му залишку лізіна, що сприяє компактизації гетерохроматина з утворенням щільних зон з високоафінними сайтами зв'язування гістона H3 з іншими специфічними протеїнами гетерохроматину.

Виявлена у результаті проведених досліджень тканиноспецифічна експресія гену *Suv39h2* у тканинах сім'яників та відсутність у гепатоцитах за



впливу теплового шоку, зумовлена експресією гену в сім'яниках та участю у метилуванні ДНК. У процесі диференціації у ссавців відбувається масове метилування ДНК, що визначає специфічне вимикання певних груп генів у спеціалізованих клітинах. До генів, які активно залучені в ці процеси можна віднести гени метилтрансферази *Suv39h1* та *Suv39h2*. Ці гени володіють взаємодоповнюючою дією, проте їх локалізації відрізняється. Ген *Suv39h1* розміщений на кінці Х-хромосоми і експресується в усіх тканинах, тоді як ген *Suv39h2* розміщений на 2 хромосомі, експресується переважно у сім'яниках та здатен накопичуватися у статевих тільцях. Мутації в *Suv39h1* та *Suv39h2* призводять до стерильності, внаслідок зупинки поділу сперматогоніальних клітин [545]. На відміну від соматичних клітин, *Suv39h*-опосередкованої дефекти в чоловічій мейозу викликають виражений апоптоз сперматоцитів IV стадії при переході від середини до кінця пахітени [278]. Встановлено, що *Suv39h2* впливає на організацію гетерохроматина у мейозі та задіяний у епігенетичному імпринтингу у зачатків чоловічих статевих клітин [432]. Доведена взаємодоповнююча ензимна активність *Suv39h1* та *Suv39h2* в ембріогенезі та розвитку мишей [685]. За даними гістологічних досліджень, на нокаutowаних за геном *Suv39h* мишей виявлено зупинку дозрівання сперматоцитів у ранній пахітені, що призводить до високої васкуляризації сім'яних каналців та порушенні нормального розвитку сім'яників [300, 351, 559, 680].

Дослідження останніх років показують, що порушення в організації геномного матеріалу у сперматозоїдах негативно позначаються на їх здатності до запліднення та нормального ембріонального розвитку [304, 350]. Зниження загального рівня або зміни специфічності метилування ДНК не впливає на здатність до запліднення сперматозоїда, але порушує ембріональний розвиток [304]. Крім того, при використанні у ДРТ незрілих сперматозоїдів чи сперматид при діагнозі чоловічої неплідності, підвищує частоту народження дітей з хворобами імпринтинга (синдром Ангельмана та Відемана-Беквита) [588]. Узагальнюючи літературні дані та отримані результати досліджень, можна

стверджувати, що оскільки Suv39h-залежне H3-K9 метилування є одним з найбільш ранніх вимог, що визначає успішність мейозу, то однією з причин стерильності чи низької запліднювальної здатності внаслідок тривалої гіпертермії може бути Suv39h-опосередкований вплив на сперматоцити за мейотичного поділу клітин.

Ще одним механізмом епігенетичної регуляції геному є ацетилювання гістонів. Обидва ці процеси – ДНК-метилування та ацетилювання гістонів – за сумісної дії HDAC-активності та промоторного метилування, здатні переводити хроматин в транскрипційно неактивний стан [349]. Гіпертермія супроводжується зміною експресії позитивних та негативних регуляторів клітинного циклу. Нами встановлено, що транскрипція деяких генів ранньої відповіді, зокрема, *Hdac1*, в гепатоцитах мишей репресована і майже не активується за умов гіпертермії, тоді як в сперматогенних клітинах рівень експресії зростає. Оскільки статеві клітини є більш чутливими до дії різних чинників, то, очевидно, тепловий шок призводить до активації механізмів, які контролюють компактизацію хроматина сперматозоїдів [324, 449], чим і зумовлений ріст експресії гену *Hdac1*. Hdac4-гістонова деацетилаза є ензимним компонентом комплексу, який викликає транскрипційну репресію генів, каталізуючи реакцію видалення ацетильної групи ε-N-ацетил-лізину гістонів та формування компактної структури нуклеусом [319, 341, 360]. При модифікації гістона та зміні конформації хроматину, гістондеацетилази відіграють важливу роль у регуляції експресії генів [352].

При сперматогенезі проходить декілька етапів ремоделювання хроматину, що зумовлене заміною білків, пов'язаних з хроматином та/чи їх модифікацією. Послідовна заміна гістонових протеїнів на аргінін-багаті протаміни забезпечує високу ступінь компактизації хроматину в сперматозоїдах та необхідна для мінімізації об'єму головки сперматозоїда, захисту цілісності генетичного матеріалу, а також контролю сперматогенезу [226]. Встановлено, що біля 15% гістонових протеїнів не змінюється.

Протамінування хроматину напряду пов'язано з забезпеченням функціональної цілісності геному сперматозоїда.

Вибір клітинами альтернати – апоптоз чи зупинка циклу – за генотоксичного стресу залежить від їх типу, однак він ще не досліджений. З'ясування механізму тканиноспецифічної відповіді на стрес вимагає детальних досліджень додаткових факторів. У наших дослідженнях було встановлено, що гіпертермія викликає зміну транскрипції деяких генів ранньої відповіді, зокрема протоонкогену *c-fos*. Так, на відміну від тканини сім'яників, у гепатоцитах експресія гену *c-fos* репресована і майже не активується за дії теплового шоку, що, очевидно, пов'язане з формуванням компактної структури нуклеосоми в промоторі гену *c-fos* та викликане деацетилюванням гістонів (рекрутуванням гістон-деацетилазної активності).

Результати наших досліджень показали, що гіпертермія викликає зростання рівня експресії гену *Mdm1* в сперматогенних клітинах та її відсутність в гепатоцитах. Одним із механізмів відповіді гену *Mdm1* на тепловий шок, на нашу думку, пов'язаний з активацією транскрипційного фактора HSF2. Згідно з даними [458], транскрипційний фактор HSF2 бере участь у регуляції транскрипції гена *Mdm1* у сперматоцитах, зв'язуючись з його промоторною ділянкою у відповідь на гіпертермію [457]. Також не виключена й дія двох транскрипційних факторів HSF1 та HSF2, які хоч і взаємопов'язані, однак механізми їх дій різні. За гіпертермії HSF1 інкубує експресію генів теплового шоку, зокрема *Mdm2*, підтримує баланс між апоптозом та виживанням чоловічих гамет, тоді як HSF2 відіграє важливу роль при формуванні сперматогенезу, зокрема, поділі та дозріванні статевих клітин [654].

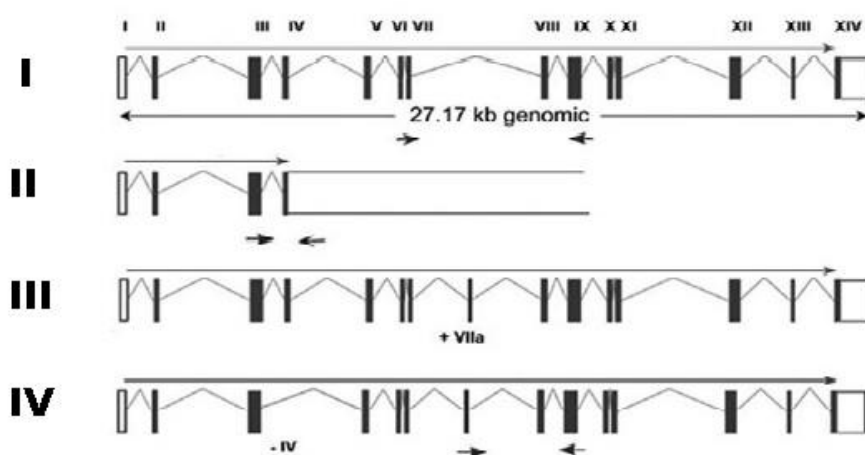
Отже, контроль за експресією гену *Mdm1* в умовах стресу тканиноспецифічний та здійснюється на різних рівнях, можливо, залучає також взаємодоповнюючу активацію гену *Mdm2*, який контролює рівень p53 [285, 622]. За незначного пошкодження структури ДНК активований p53 індукує транскрипцію генів, а також протеїнові продукти, які беруть участь у

зупинці клітинного циклу, що дозволяє клітині репарувати пошкодження ДНК. У випадку значних пошкоджень ДНК протеїн p53 активує експресію проапоптотичних генів, зокрема *Mdm2*, *Fas*, *bax*, *p53* [239, 678]. За сперматогенезу p53 регулює проліферацію та апоптоз сперматогоній [278, 282, 494]; він необхідний для індукції апоптозу премейотичних клітин у відповідь на генотоксичний стрес та усунення пошкоджених клітин [278].

Для подальших досліджень серед усіх досліджених нами генів першої групи обрано ген *Mdm1*, оскільки він є найменш вивченим. Ми знайшли всього декілька десятків посилань на роботи, присвячені вивченню цього гену. Тоді як ген *Mdm2* – добре вивчений. Функція протеїнів Mdm1 [OMIM 613813] та Mdm2 [OMIM 164785] вперше була встановлена у міні хромосомах мишей у трансформовано похідних клітинах NIH3T3 [376, 454]. Однак, ці два гени подібні за назвою, проте їхні функції відрізняються. Білок Mdm1 належить до ядерних протеїнів, які локалізуються у центральних клітинах та пов'язані з триплетами мікротрубочок. Натомість Mdm2 є онкогенним продуктом E3 убіквітинлігази та відіграє важливу роль у стабілізації та підвищенні транскрипційної активності білка p53.

На сьогодні, у гена *Mdm1* мишей відомо 4 транскрипти. Найпершим був виявлений 1-й довгий транскрипт (I), який містить 14 екзонів (GI: 27229284), кодує білок з молекулярною масою 79,6 кДа та містить 708-амінокислот та 2-й короткий транскрипт (II) (Рис. 4.1), до складу якого входить тільки перших чотири екзони і кодує білок із вмістом 222-амінокислот та молекулярною масою 25,1 кДа (GI: 6754669) (рис. 4.1).

Ідентифіковано також 3-й транскрипт, який відрізняється від 1-го довгого транскрипту наявністю додаткового 15 екзону (GI: 1064299) [322]. Цей додатковий екзон VIIa розташований між VII і VIII екзонами та містить 30 пар нуклеотидів у рамці додаткової послідовності. Значення цієї ділянки додаткового екзону невідома. Проведення гомологічного пошуку на основі секвенції показали, що ділянка 30 пн також присутня у Mdm1 транскрипті людини.



**Рис. 4.1. Схематична структура ізоформ гену *Mdm1*.**

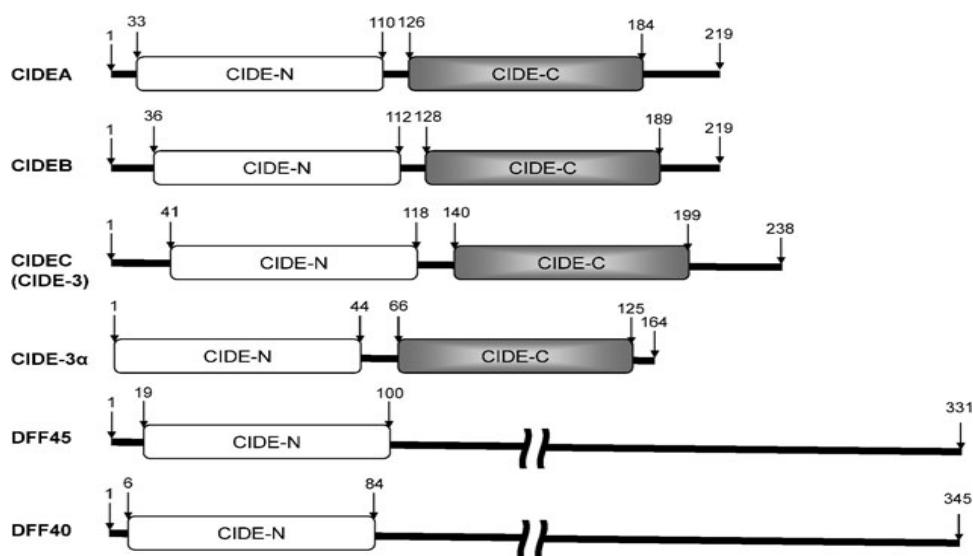
У результаті клонування отримано варіант гену *Mdm1*, секвенування якого показало наявність альтернативного сплайс-варіанту 3 мРНК гену *Mdm1* (Асс. No: NM\_001162904), що містить додатковий екзон VIIa. Ідентифікований у сім'яниках мишей 3-ій транскрипт гену *Mdm1*, вказує на важливу роль гену *Mdm1* у регуляції сперміогенезу мишей та в подальшому дозволить з'ясувати адаптаційні механізми репродуктивних клітин за впливу стресових чинників. Можливо, у відповідь на гіпертермію в тканинах сім'яників активується експресія різних транскриптів гену *Mdm1*, що зумовлено їх різним функціональним значенням.

До другої групи віднесено гени, експресія яких за теплового шоку виявлена в гепатоцитах та відсутня в яєчках. Так, на відміну від сім'яників, у тканинах печінки відзначено активність генів *Cideb* та *Dnaja* за дії гіпертермії. У цій групі наша увага була зосереджена на детальному вивченні особливостей експресії гену *Cideb*, оскільки ген *Dnaja* належить до родини шаперонів, а їх активація є класичною відповіддю на гіпертермію.

До родини протеїнів CIDE (The cell death-inducing DFF45-like effector) відносять *Cidea*, *Cideb* та *Fsp27* (*Cidec*) [667]. Ці протеїни містять еволюційно збережений CIDE-N-домен DFF40/CAD, який гомологічний до N-кінцевої ділянки фактора фрагментації ДНК (DFF 40/45) [344, 422, 676] та CIDE-C

домен, що є унікальним для CIDE білків [480] (рис. 4.2).

Дослідження гену *Cideb* за дії гіпертермії на організм самців-мишей *in vivo* показало, що рівень його експресії значною мірою залежить від типу тканин. Це зумовлено їх різною здатністю адаптації до дії стресу. Встановлено, що ген *Cideb* експресується як у печінці, так і в шлунку, кишківнику, нирках та товстому кишківнику, і їх експресія суттєво змінюється під впливом теплового шоку.



**Рис. 4.2. Схематична структура протеїнів родини CIDE: порівняння CIDE-N та -C доменів.**

Характер експресії гену за гіпертермії відрізняється в цих органах. Так, гіпертермія посилює експресію у печінці, кишківнику та нирках, і знижується у шлунку та яєчках мишей. Виявлений тканинспецифічний характер експресії *Cideb* за дії гіпертермії, узгоджується з даними літератури [474]. Конститутивно високий рівень експресії *Cideb* характерний для тканин з високим рівнем катаболізму жирних кислот: жирова тканина, печінка, мозок, скелетні м'язи [471, 666, 684]. Значна експресія також спостерігається в нирках, наднирниках, кишківнику, жировій та інших тканинах [475]. *Cideb* контролює синтез жирних кислот та секрецію ЛПДНЩ у гепатоцитах, обмін

холестеролу, інсуліну, профіль експресії генів, пов'язаних з біосинтезом та зберіганням холестеролу [379, 474, 673, 676].

Водночас у дослідженнях *in vivo* встановлено, що у тканинах сім'яників та сперматоцитах мишей експресія *Cideb* суттєво не змінюється, порівняно з іншими досліджуваними тканинами. Встановлено, що характер експресії *Cideb* у цих тканинах залежить від ступеню гіпертермії. Так, за температури 38°C експресія гену у контрольних та дослідних тканинах не змінюється, тоді як за 42°C підвищення експресії *Cideb* у сім'яниках спостерігається через 2, 6 та 24 год від початку теплового шоку.

Експресія альтернативного сплайсинг-варіанту *Cideb*, кодуючого протеїн, який сприяє апоптозу, не виявлена в інших досліджуваних тканинах, а вона індукується під впливом теплового шоку лише у сім'яниках контрольних та дослідних тварин, причому інтенсивність індукції посилюється за тривалого впливу температури. Ймовірно, що за гіпертермії індукція експресії додаткового сплайсинг-варіанту *Cideb* у сім'яниках мишей є адаптаційною реакцією на шкідливі дії теплового шоку.

Оскільки встановлено, що протеїни CIDE мають гомологію з N-кінцевим регіоном фактора фрагментації ДНК (DFF40/45) [473, 478], то належать до проапоптичних протеїнів. Однак, встановлена відмінність щодо механізмів індукції апоптозу різними протеїнами родини CIDE. Встановлено, *Cidea* індукує апоптоз каспазозалежним шляхом, тоді як *Cideb* та *Cidec* сприяють вивільненню цитохрому з мітохондрій та активують апоптоз через каспазу-9, а також активність каспази-3 [373, 472, 629]. *Cideb* локалізований у мітохондріях у двох молекулярних формах – гомодимери та гетеродимери. Мітохондріальна локалізація *Cideb* та його здатність до димеризації, відіграють важливу роль у функціональній активності протеїну [399, 624]. *Cideb* безпосередньо взаємодіє з протеїнами родини Bcl-2, зокрема Bcl-2 і Bcl-XL, хелатуючи анти-апоптотичні протеїни та індукуючи апоптоз. Установлено, що 30 амінокислотних залишків (від 166 до 195) на C-кінцевій ділянці *Cideb* сприяють як димеризації, так і виступають як локальний сигнал

мітохондрій [676]. Також можливо, що *Cideb* може безпосередньо викликати мітохондріальні зміни, зокрема мембранний потенціал мітохондрій, індукцію активних форм кисню, що викликають апоптоз.

Результати досліджень показали, що за високого ступеня тестикулярної гіпертермії виявлена експресія додаткового сплайсинг-варіанту *Cideb* у сперматоцитах мишей, що можливо дозволить з'ясувати молекулярні механізми зниження чоловічої фертильності на тлі метаболічного синдрому, оскільки доведено, що абдомінальне ожиріння негативно впливає на функціональний стан гіпофізарно-гонадної системи, сприяє зниженню об'єму еякуляту, відсотку нормальних сперматозоїдів, підвищує фрагментацію ДНК сперматозоїдів [38, 75].

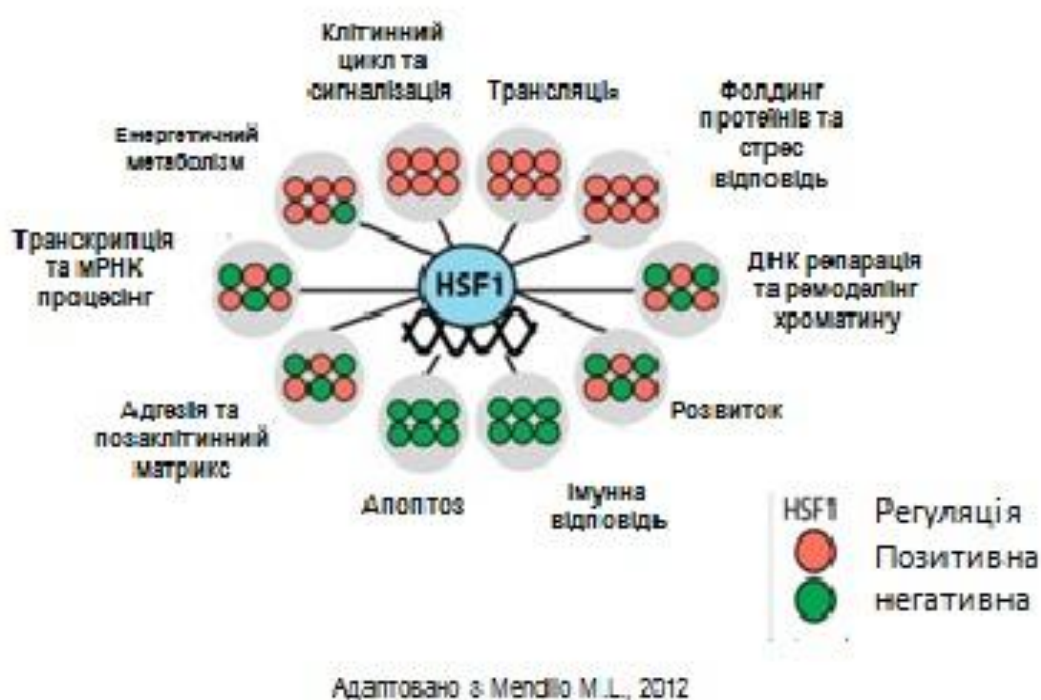
Відомо, що гіпертермія впливає на експресію ряду генів, а також призводить до змін структури молекул цитоскелета і мембрани, корегує клітинний цикл та клітинні функції, зокрема апоптоз, репарацію ДНК. Так, за дії теплового шоку відмічено зміну експресії гена попередника тирозинової кінази *ErbB3*, який відноситься до системи клітинного поділу, і в сім'яниках, і в гепатоцитах. Однак, при гіпертермії експресія цього гена в тканинах сім'яників зростає у порівнянні з контролем, тоді як в гепатоцитах його висока активність відмінена у всіх групах.

Тепловий стрес індукує перебудову структури хроматину, внаслідок чого змінюється активація генів теплового шоку [275, 310, 500]. Так, у дослідженнях в обох тканинах відмічено більш значне зростання експресії *Hsp90ab1* за температурного шоку, ніж *Hsp90aa1*. Отримані результати узгоджуються з даними авторів про те, що на відміну від інших білків теплового шоку, вміст Hsp90 в клітинах при нормальних умовах досить високий – до 1% від суми всього цитозольного білка [412] і дещо зростає при стресі [606, 650]. Ізоформи Hsp90 характеризуються органо- та тканеспецифічною конститутивною експресією та різняться інтенсивністю відповіді на дію стресу [371, 398]. Різниця в характері експресії різних генів теплового шоку за дії гіпертермії вказує на те, що регуляція експресії



кожного гену має свої особливості, а кодовані нею гени *Hsp70*, *Hsp90* виконують специфічні функції в межах роботи шаперонової системи.

Отримані результати дозволяють зробити припущення, що зміна експресії генів у клітинах різних тканин організму у відповідь на гіпертермію викликає активування факторів теплового шоку HSF1 та HSF2.



**Рис. 4.3. Загальна схема регуляції клітинних процесів транскрипційним фактором HSF1.**

Активація HSF1 проходить за дії теплового шоку, солей важких металів, інгібіторів протеосом та інших стрес-індукуючих факторів, він належить до головних регуляторів активності HSP, тоді як HSF2 відіграє важливу роль у процесах розвитку організму. HSF1 забезпечує нормальне функціонування сперматогенезу, оскільки встановлено, що *Hsf1*-мутантні самці продукують менше сперматозоїдів щодо мишей дикого типу [573]. Однак, підвищена концентрація HSF1 негативно впливає на репродуктивні

процеси у самців мишей, зокрема, викликає апоптоз у сперматоцитах, знижує дозрівання гамет та веде до безпліддя [527, 649, 662, 678].

Доведено, що HSF1 та HSF2 необхідні для правильної організації хроматину протягом сперматогенезу [275, 276], також обидва фактори можуть утворювати гетеротримери у хроматині [574]. Ці дані вказують на функціональну взаємодію між HSF1 і HSF2 при сперматогенезі за нормальних умов.



**Рис. 4.4. Схема регуляції біологічних процесів за участю транскрипційного фактора HSF2.**

Активація HSF1-залежної транскрипції проходить у результаті взаємодії HSF1/HSF2 як при фізіологічній температурі, так і за дії стресу [404, 485, 537, 587, 654]. Зокрема, HSF2 може брати участь у модуляції відповіді на тепловий шок у клітинах сперматогоній мишей шляхом формування гетеротримерів між HSF1 та HSF2 [177, 503, 574]. Гени, промотори яких є спільними для обох факторів як HSF1 і HSF2 в сперматоцитах миші кодують в основному шаперони та ко-шаперони, які здійснюють рефолдинг неправильно звернутих пептидів та запобігають формуванню білкових агрегатів. Отже, обидва фактори можуть брати участь в регуляції транскрипції ряду генів при фізіологічній температурі, деякі з генів можуть бути регульовані обома

факторами за дії м'якої гіпертермії при 38°C, тоді як гіпертермія при 43°C викликає різну експресію. Встановлено, що за дії температури 43°C підвищується зв'язування HSF1 з промоторами шаперонів та інших генів, пов'язаних зі стресом, тоді як HSF2 майже повністю втрачав таку здатність [457]. Отримані результати дозволяють зробити припущення, що зміна експресії генів у клітинах різних тканин організму у відповідь на гіпертермію, викликає активування факторів теплового шоку HSF1 та HSF2.

Залежність впливу температурних режимів на ДНК-зв'язувальну здатність факторів HSF1 та HSF2 вивчали як на культурі клітин *in vitro* [648], так і в дослідженнях *in vivo* [537, 587, 635]. Показано, що надлишкова експресія HSF1 індукує апоптоз у сперматогенних клітинах за відсутності активації генів БТШ [649, 661]. Тому дисбаланс у HSF1/HSF2 взаємодії та їх хроматин-зв'язувальна здатність у сперматогенних клітин за надмірної гіпертермії впливає на їх життєздатність за умов стресу. За дії теплового шоку в сім'яниках миші порушується взаємодія між HSF1 та HSF2 та їх хроматин-зв'язувальна здатність, що викликає стрес-чутливість сперматогенних клітин, оскільки взаємодія обох факторів є необхідною для нормального перебігу сперматогенезу.

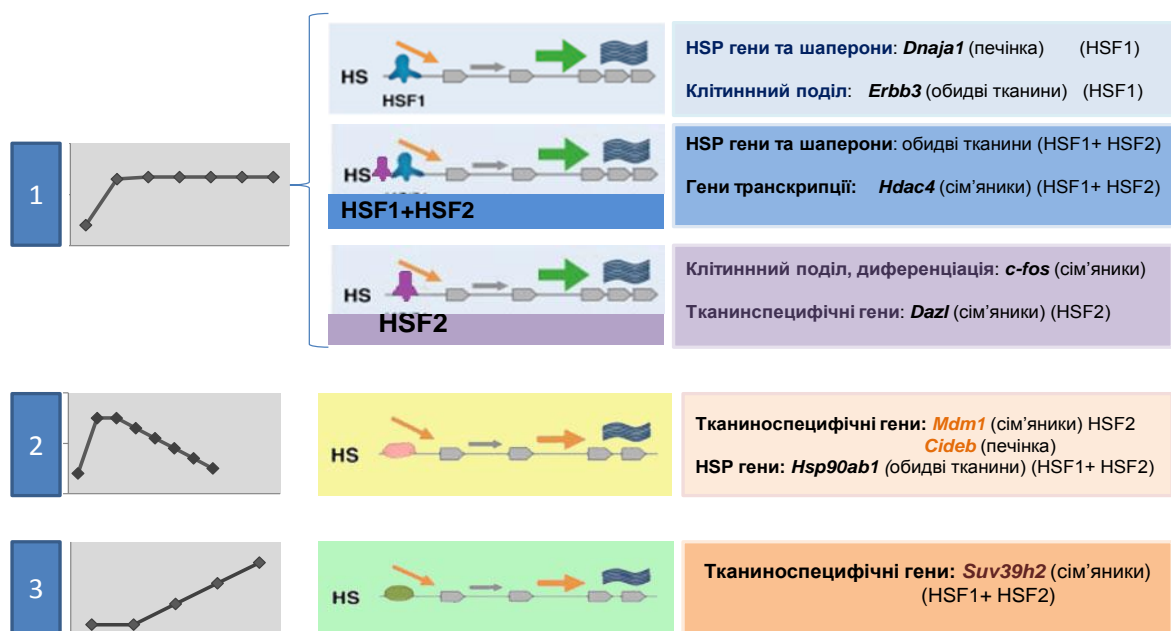
На підставі аналізу джерел літератури та результатів досліджень доповнено дані щодо молекулярно-генетичних особливостей регуляції сперматогенезу за термічного стресу і запропоновано комплексну схему диференціальної регуляції експресії генів за активації транскрипційних факторів HSF1 та HSF2, залежно від характеру експресії за гіпертермії (рис.4.5).

**Група I** вміщує гени, експресія яких індукується тепловим шоком і підтримується на високому рівні впродовж доби після дії гіпертермії. Активація транскрипції більшості представників цього класу відбувається за участі HSF1 у кооперації з HSF2: до них належать стрес-індуковані HSPs в обох типах досліджуваних тканин та *Hdac4* у сім'яниках. До цього класу також відносять гени, активація яких проходить за участі HSF2 у сім'яниках:

*Dazl*, *c-fos*. Аналогічну експресію спостерігали для генів, в активації яких задіяний лише фактор HSF1: *ErbB3* тирозинова кіназа в обох тканинах та гомолог Hsp40 *Dnaja1* у печінці.

До другої групи відносять гени, рівень експресії яких за гіпертермії зростає відразу, однак поступово спадає. Гени, що представляють цю групу, мають тканинспецифічний профіль експресії: *Mdm1* у сім'яниках за активації HSF2 та *Cideb* у печінці.

III групу складають гени, активація транскрипції яких відбувається на більш пізніх стадіях клітинної відповіді на тепловий стрес. Так, експресія гена *Suv39h2* у сім'яниках регулюється обома транскрипційними факторами HSF1+ HSF2, та індукується через певний час після впливу. Також в обох тканинах спостерігається експресія гена *Hsp90aa1*, в активації якого задіяні фактори HSF1+ HSF2.



**Рис. 4.5.** Схема молекулярних механізмів регуляції сперматогенезу за впливу теплового шоку.

Останнім часом значну увагу приділяють корекції мікроелементного статусу за використання комплексу біологічно активних речовин [23, 61, 220, 234, 247]. Застосування мікроелементів з профілактичною метою дозволяє скорегувати відхилення в мінеральному обміні на початкових етапах за недостатнього надходження мікроелементів до організму, а також забезпечити їх депонування для стимулювання відтворювальної здатності самок у прекоцепційний період, що підвищить імплантаційну та запліднювальну здатність [52, 103]. Відомо, що з настанням вагітності істотно змінюються потреби організму, посилюється обмін речовин та виснажується депо вітамінів, мікро- і макроелементів [35, 321]. Доведено, що життєздатність нащадків, їх фізіологічна зрілість, імунобіологічна реактивність та розвиток безпосередньо залежить від рівня годівлі матері [111]. Забезпечення самок мінеральними речовинами впливає на клінічний стан, метаболічний статус і резистентність організму, продуктивність та репродуктивну здатність [35, 52, 103, 321].

Незважаючи на великий вибір на ринку біологічно активних препаратів, які регулюють і відновлюють обмінні процеси та активізують репродуктивну систему самок, проблема інтенсифікації відтворення та отримання здорового молодняку залишається досить актуальною. Тому розробка нових негормональних, біотехнологічних препаратів для стимуляції відтворювальної здатності самок залишається актуальним напрямком наукових досліджень, що має велике значення у вирішенні практичних питань біотехнології відтворення тварин.

Застосування мікроелементів у формі хелатних (органічних) сполук є більш ефективним, оскільки вони краще засвоюються [2, 246] і проявляють значну стимулювальну дію на організм [190]. Біологічна активність металу в цих комплексах зростає у сотні разів порівняно з його активністю у вільному стані [80, 92]. Доведено, що сполуки Цинку з амінокислотами краще впливають на формування організму, репродуктивні функції та імунний захист у молодих і дорослих тварин, ніж оксид цинку. Щодо хелатних сполук

хрому (III), то їх вплив на вагітність обмежена кількома дослідженнями. Так, дослідженнями Bailey M.M. (2006) при порівнянні результатів згодовування мишам упродовж 6-17 діб гестаційного періоду хром-пікулінату і хлориду хрому встановлений негативний вплив хром-пікулінату на розвиток плодів [294]. Однак, при порівнянні впливу хром-пікулінату та пікулінової кислоти на неврологічний розвиток потомства виявлено негативний вплив пікулінової кислоти [293]. Вищий відсоток вагітності також спостерігали за додавання до раціону корів хром-метіоніну [313]. Тому значна увага приділяється органічним сполукам біогенних елементів, отриманих шляхом синтезу мікроелементів з амінокислотами.

У літературі відсутня інформація про вплив глутаматів цинку, мангану, хром метіонату на процес запліднення та приживлення ембріонів. Тому доцільно поєднати їх в одному препараті та дослідити його вплив на відтворну функцію самок. Було встановлено, що органічні сполуки мангану та цинку у досліджуваних концентраціях не мають цитотоксичного впливу на клітини лінії NIH3T3. За низьких концентрацій глутамату мангану (0,08 і 0,16 мкг/мл) та глутамату цинку (0,1 і 0,15 мкг/мл) спостерігали високу життєздатність клітин і зростання індексу проліферації клітин, що вказує на функціональну активність культури клітин. Вищі дози глутамату мангану (0,32 мкг/мл) та глутамату цинку (0,25 мкг/мл) суттєво не інгібують проліферативну активність ембріональних фібробластів за зниження активності ЛДГ у кондиційному середовищі. Внесення до культурального середовища сульфату мангану та цинку в концентрації 0,1 мкг/см<sup>3</sup> призводило до зниження рівня проліферації клітин у дослідних групах порівняно з контрольною впродовж 72-ох год культивування.

При встановленні оптимальної дози хром-метіоніну проведено дослідження *in vitro* на первинно-трипсинізованих культурах ембріональних фібробластів і клітинах ендометрію. Це дозволило виявити безпосередній вплив хелатної сполуки Хрому (III) на репродуктивні клітини і

спрогнозувати ступінь чутливості тканин, оскільки первинній культурі клітин властиве збереження більшого ступеня індивідуальності.

Встановлено, що хром-метіонін у концентраціях 0,03, 0,05 та 0,25 мкг/мл не має цитотоксичного впливу на ембріональні фібробласти, оскільки впродовж культивування в усіх дослідних групах відзначено зниження концентрації глюкози в кондиційному середовищі, що опосередковано може свідчити про функціональну активність клітин. Хром-метіонін в дозі 0,03 мкг/мл викликає вірогідне підвищення проліферативної активності ембріональних фібробластів ( $p < 0,01$ ) впродовж культивування, тоді як вищі дози хрому (0,05 та 0,25 мкг/мл) пригнічують ріст клітин, а на 48 год культивування проліферативна активність клітин знижується вдвічі. При тестуванні хром-метіоніну на клітинах ендометрію корів також спостерігали аналогічний дозозалежний вплив. Хром-метіонін у дозі 0,03 мкг/мл викликає підвищення проліферативної активності клітин ендометрію, тоді як вищі концентрації гальмують ріст клітин.

Дослідження *in vitro* органічних форм мангану, цинку та хрому показали відсутність цитотоксичного впливу і дозволили визначити їх оптимальні діючі концентрації на стандартизованих лініях клітин та культурі клітин репродуктивних органів. Це дозволило продовжити вивчення їх впливу на лабораторних та сільськогосподарських тваринах.

Аналіз результатів морфометричних досліджень показав, що згодовування хром-метіоніну позитивно впливає на репродуктивну здатність кролиць, прояв статевої охоти, запліднення, ріст і розвиток ембріонів та їх імплантацію. Додавання до раціону кролицям хром-метіоніну впродовж 6-ти тижнів перед осіменінням у дозі 25 мкг/голову на добу стимулює репродуктивну функцію самиць, підвищує заплідненість та імплантацію ембріонів. Це також дозволило отримати максимальну кількість плодів та найнижчу доімплантаційну смертність, порівняно з контролем, тоді як після додавання до основного раціону хром-метіоніну у дозі 50 мкг/гол на добу

спостерігали підвищення кількості резорбцій лише у постімплантаційний період.

Морфологічний склад крові, окрім індивідуальних характеристик, статі, породи, також безпосередньо залежить від умов довкілля, годівлі, тому зміни крові дозволяють оцінити вплив екзогенних та ендогенних факторів на фізіологічний стан тварин. Показано, що у крові кролиць за додаткового введення до їх раціону хром-метіоніну у дозі 25 та 50 мкг/гол/день впродовж 6-ти тижнів до запліднення гематологічні показники крові знаходилися у межах фізіологічної норми. Збільшення кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну у крові кролиць після додавання хром-метіоніну у дозі 25 мкг/гол/добу, порівняно з контролем, вказує на активацію в організмі гемопотезу і збільшення використання кисню тканинами та про вищу готовність самиць до суcriльності. Згідно з даними [149] збільшення в крові кількості еритроцитів та їх насичення гемоглобіном позитивно корелює зі зростанням репродуктивних якостей і відтворювальної функції.

Важливим показником інтенсивності обміну речовин в організмі під час вагітності є вміст загального протеїну у крові. При вагітності посилюються обмінні процеси, що призводить до перерозподілу протеїнових фракцій внаслідок збільшення потреб організму у багатьох специфічних білків-переносників. Виявлено зростання вмісту загального протеїну та альбуміну у крові кролиць 2-ої дослідної групи, що вказує на посилення протеїносинтезувальних процесів. Зміни, які відбулися у протеїновому обміні кролиць за дії хром-метіоніну, також можуть бути пов'язані зі зростанням активності глюконеогенезу у відповідь на поступлення метіоніну як глюкогенної амінокислоти, що позитивно вплинуло на встановлення суcriльності. При визначенні активності АсАТ та АЛТ вірогідних змін між контрольною та дослідними групами не виявлено, що вказує про відсутність негативного впливу хром-метіоніну на організм кролиць при суcriльності.

У період відновлення статевої функції у самок, запліднення, росту і розвитку ембріонів встановлено циклічну лабільність гомеостазу



метаболических процессов у репродукции самки [211]. Доведено, що активність прооксидантних і антиоксидантних ензимів та продуктів пероксидації у репродуктивних тканинах суттєво зростає під час статевої охоти та в критичні періоди ембріогенезу, коли істотно змінюється середовище існування зародків [249]. Показано, що додавання Cr(III)Met до раціону кролиць у кількості 25 та 50 мкг/гол/добу проявляє інгібуючий вплив на кінцеві стадії гідропероксидного окиснення ліпідів в організмі самок. Концентрація ТБК-активних продуктів, які є кінцевими продуктами пероксидного окиснення ліпідів, у плазмі крові кролиць 1-ої та 2-ої дослідних груп була вірогідно меншою, ніж у плазмі крові кролиць контрольної групи. Отриманий ефект можна пояснити здатністю сполук Хрому(III) при взаємодії з пероксидами ліпідів знижувати рівень пероксидного окиснення [83, 332]. Додаток Cr(III) до раціону призводить до послаблення процесів пероксидації ліпідів і посилення дії інсуліну, що, очевидно, зумовлено активацією інсулінових рецепторів на мембрані клітин [497]. В інших дослідженнях показано, що Cr(III) відіграє важливу роль у підтриманні нормального рівня глюкози в крові, зниження рівня холестеролу і тригліцеролів у плазмі, інгібуванні розвитку оксидативного стресу й секреції прозапальних цитокінів [204, 235, 332, 429].

Ефективність ензимної ланки має вирішальне значення у підтримці прооксидантно-антиоксидантного балансу в організмі [8, 56]. Встановлено, що введення до раціону хром-метіоніну активність ГП ( $p < 0,05 - 0,01$ ) та каталази ( $p < 0,05$ ) в обох дослідних групах була вищою, ніж у контролі, тоді як вірогідної різниці в активності СОД у плазмі крові кролиць обох дослідних груп, порівняно з контролем, не виявлено. Зміни активності каталази є адаптивною реакцією організму за дії  $\text{Cr}^{3+}$  на зростання інтенсивності метаболічних процесів, викликаних збільшенням у крові тварин дослідних груп інсуліну, який має потужний анаболічний ефект. Отримані дані підтвердили результати дослідження інших авторів, які

встановили, що  $\text{Cr}^{3+}$  виявляє регуляторний вплив на експресію генів антиоксидантних ензимів – СОД, каталази й глутатіонпероксидази [82, 331].

Отже, додавання кролицям хром-метіоніну в досліджуваних дозах перед заплідненням сприяє зростанню інтенсивності обмінних процесів, позитивно впливає на формування системи антиоксидантного захисту в організмі кролиць у період запліднення і на ранніх стадіях вагітності.

Біологічна дія біокоординаційних сполук на репродуктивну здатність самок, певні періоди її встановлення є мало вивченою. Виокремлюються певні критичні періоди, які характеризуються інтенсивним поділом клітин та формуванням органів [189, 456], а, отже, негативний вплив різних чинників у цей термін є особливо відчутним [31, 100, 248, 321]. Нестача мікроелементів викликає порушення відтворювальної функції, зокрема розлади і порушення генеративної функції яєчників під час статевого циклу, що призводить до зниження ембріональної смертності і заплідненості.

Дослідження впливу глутамату мангану та глутамату цинку у формі ліпосомального препарату на запліднюваність та імплантаційну здатність самок щурів, виявили, що за введення глутамату мангану до та при заплідненні вірогідно зростала кількість жовтих тіл вагітності в яєчниках та імплантацій зародків на одну самку порівняно з контрольною групою ( $p < 0,001$ ). Введення глутамату мангану та цинку сприяють ембріональному розвитку, що підтверджується вірогідним підвищенням кількості живих плодів на 1 самицю ( $p < 0,001$ ), ( $p < 0,01$ ) стосовно показників контрольної групи. Визначення величин резорбцій плодів дало змогу установити найнижчі показники ембріональних втрат при застосуванні глутамату мангану при заплідненні та глутамату цинку до запліднення. Очевидно, це пов'язано з посиленням метаболічних процесів у зв'язку зі здатністю Мангану активувати ензими та регуляторні медіатори [273], які впливають на обмінні процеси в репродуктивних органах і гіпоталамо-гіпофізарній ендокринній системі самок [136, 397], що підвищує репродуктивну функцію, імплантаційну здатність та приживлюваність ембріонів [170, 197]. За результатами численних

досліджень, під впливом препаратів Мангану підвищується рівень статевих гормонів і фолікулостимулюючого гормону [548]. Манган впливає на оогенез, виношування плода, вигодовування новонароджених, запобігає дегенеративним змінам статевих залоз [446]. Він бере активну участь в окисно-відновних процесах у тканинах [273], впливає на ріст і розмноження тварин, а також на процеси кровотворення, регулює функцію ендокринних залоз, посилює дію вітамінів, входить до складу ряду ензимів та є їхнім активатором [136, 397].

Введення глютамату мангану позитивно впливає на масометричні показники яєчників, що підтверджено індексом стимуляції, який складає 1,06 та 1.14 у 1-й та 2-й дослідних групах, відповідно. Наші результати узгоджуються з даними інших авторів [225, 231, 456], які пов'язують підвищення запліднювальної здатності та репродуктивної функції самок загалом з індукуючим впливом мікроелементів на метаболічні процеси та, зокрема, використанням органічних сполук мікроелементів. Структура біокоординаційних хелатних сполук сприяє збільшенню їх проникності через клітинні мембрани та модулює доступність для різних клітинних рецепторів, а глютамінова кислота, за рахунок включення в енергетичні та пластичні обмінні процеси, впливає на функціональний стан тканин та органів за вагітності, а також стимулює гіпоталамо-гіпофізарну систему. Доведено, що солі марганцю, міді та цинку впливають на репродукцію, мінеральний обмін молочних корів, 1-2-річних телиць і рівень запліднення при штучному осіменінні [274].

Встановлено, що введення глютамату мангану у формі ліпосомальної емульсії більш ефективно впливає на репродуктивну систему та процеси ембріонального розвитку при заплідненні самок щурів, тоді як дія глютамату цинку найкраще виявляється до їх запліднення. Одержані результати співпадають з даними інших науковців щодо позитивного впливу цинку і йоду на стимуляцію генеративних процесів в яєчниках [105]. Цинк необхідний для нормального дозрівання ооцитів, овуляції, лютеолізу та

атрезії фоліклів [17, 382]. Даний елемент пов'язаний з багатьма факторами транскрипції, необхідний для стабілізації рибосом, забезпечує контроль експресії генів у процесі проліферації і диференціювання клітин [48, 242]. Тому його наявність у період статевого розвитку та ембріогенезу є обов'язковою особливою необхідною. Біологічна роль Цинку в організмі реалізується через участь у метаболізмі протеїнів, процесах енергетичного обміну, обміні тестостерону, сперматогенезі, біосинтезі гема, синтезі та стабілізації нуклеїнових кислот і білків, проліферації та диференціюванні клітин, підтриманні антиоксидантного статусу [5, 222, 306]. Цинк також бере участь у формуванні чутливості до різноманітних гормонів і факторів росту, регулює естроген-залежні процеси [225, 231, 382]. Дефіцит цього мікроелемента впливає на функцію передньої долі гіпофіза, гальмуючи її здатність продукувати і вивільняти лютеїнізуючий та фолікулоstimулюючий гормони. Це пояснює стимулювальний вплив глютамату цинку на генеративну функцію яєчників та запліднювальну здатність самок щурів.

Під час вагітності відбувається перебудова організму, зокрема ліпідного обміну. Наднирники і плацента посилено утилізують ліпопротеїди для синтезу стероїдних гормонів, необхідних для протікання вагітності, посилюються процеси окиснення, підвищується рівень холестеролу в крові та концентрація ліпопротеїдів низької щільності, які переносять холестерол.

Встановлено, що глютамати цинку та мангану підвищують рівень показників ліпідного обміну, забезпечують загальну адаптацію обміну речовин в організмі самки щурів за вагітності до посиленої передачі поживних речовин плоду. Дані ліпідограми показують, що рівень загального холестеролу, та триацилгліцеролів вірогідно підвищується після додавання глютаматів мангану та цинку до запліднення ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ). За введення самкам щурів глютамату мангану до та після запліднення та цинку до запліднення спостерігали вірогідне зростання ліпопротеїдів низької щільності ( $p < 0,001$ ).

Введення глютаматів мангану та цинку до запліднення позитивно впливає на обмін речовин самки у підготовчий до вагітності період, зокрема сприяє посиленню ліпідного обміну, що дозволяє забезпечувати потреби організму в ліпідах для використання в енергетичних і пластичних процесах, а також синтезі стероїдних гормонів. Така потреба особливо актуальна при підготовці до овуляції та розвитку жовтого тіла. Зазначені зміни вказують про важливість забезпечення самки мікроелементами, зокрема Манганом та Цинком у підготовчий перед вагітністю період, що створює сприятливі умови для синтезу стероїдів, необхідних для формування потрібного за вагітності гормонального фону та підготовки матки до імплантації і розвитку ембріонів.

Значну увагу приділяють розробці та використанню препаратів нейротропно-метаболічної дії для інтенсифікації відтворювальної здатності тварин. Механізм дії цих препаратів полягає в активізації гіпоталамо-гіпофізарно-яєчникової осі, що сприяє інтенсифікації обмінних процесів у нервовій тканині в період активного функціонування статеві системи, підвищенню числа овульованих фолікулів та приживленню ембріонів [61]. Тому наступним кроком в роботі було встановлення впливу комплексного препарату органічних та мінеральних сполук біогенних мікроелементів у формі ліпосомальної емульсії на метаболічний профіль крові та показники відтворювальної здатності.

Розроблений нами препарат “Ліпоорганік” забезпечує підвищення відтворювальної здатності кролиць за рахунок поєднання органічних сполук біогенних мікроелементів – хром-метіоніну, глютамату цинку, глютамату мангану і селеніту натрію та введення їх до ліпосомальної емульсії, що забезпечує пролонгований ефект на активацію відтворювальної функції кролиць, як через пряму дію сполук на синтез гормонів, біологічно активних речовин, так і опосередковано через стимуляцію гіпоталамо-гіпофізарної системи на функцію репродуктивної системи. Введення названого препарату в особливо важливий репродуктивний період перед заплідненням змінює

гормональний фон в організмі кролиць, сприяє підвищенню морфо-функціонального стану яєчників, стимулює відтворювальну здатність самиць, що зумовлює покращення запліднюючої та імплантаційної здатності кролиць.

Одержані результати показали, що ін'єкція ліпосомального препарату кролицям за 7 діб до синхронізації статевої охоти та осіменіння відзначається збільшення кількості жовтих тіл вагітності в яєчниках, місць імплантацій та кількості живих ембріонів і найнижчий відсоток доімплантаційної загибелі плодів у порівнянні з контрольною групою. Введення кролицям ліпосомального препарату органічних сполук мікроелементів при осіменінні (2-а дослідна група) позитивно впливає на репродуктивну здатність: запліднення, імплантацію та розвиток ембріонів, оскільки у цій дослідній групі виявлено найбільшу кількість жовтих тіл вагітності, місць імплантацій та найнижчі кількості місць резорбцій та відсоток постімплантаційної загибелі плодів порівняно з контролем та 1-ою дослідною групою.

Усі морфо-функціональні зміни, що відбуваються в організмі тварин, позначаються на біохімічному складі крові. При забезпеченні сприятливих умов для розвитку плодів, мікроциркуляції органів та плаценти, впродовж вагітності спостерігають численні гемодинамічні зміни. Так, об'єм циркулюючої крові (ОЦК) збільшується на 35–45%, а маса еритроцитів – на 20–35%, порівняно з вихідним рівнем у невагітних. Приріст обсягу плазми випереджає збільшення маси еритроцитів, що призводить до зниження рівня гемоглобіну і гематокриту. Зокрема, зі збільшенням об'єму циркулюючої крові знижується вміст еритроцитів у периферичній крові, тоді як середній вміст гемоглобіну в еритроциті не змінюється. Таку тенденцію щодо кількості еритроцитів спостерігали і у наших дослідженнях, однак середній об'єм еритроцитів та середній вміст гемоглобіну в еритроцитах у дослідних групах зростає, що, очевидно, зумовлено позитивним впливом органічних мікроелементів, як входять до складу застосованого препарату. Ймовірно, встановлені зміни пов'язані з участю Мангану в еритропоезі [106]. Вища

концентрація гемоглобіну в еритроцитах крові кролиць дослідних груп вказує на вищий рівень Оксигену та інтенсивність водно-сольового обміну в організмі за дії ліпосомального препарату органічних мікроелементів.

Вагітність характеризується глибокими змінами обміну речовин та іншими фізіологічними змінами, що залучають фактично кожну систему органів. Після запліднення в організмі самки відбуваються різні зміни та адаптаційні процеси, направлені на підтримку вагітності та розвиток плоду. Впродовж вагітності зростає концентрація ліпідів, ліпопротеїдів і аполіпопротеїдів у плазмі крові, що корелює зі зростанням концентрації естрогенів, прогестерону і плацентарного лактогену. Проведені дослідження ліпідного обміну показали, що рівень загального холестеролу підвищувався у 1-й дослідній групі кролиць, яким вводили препарат за 14 діб до осіменіння. Збільшення вмісту вільного холестеролу у сироватці крові кролиць можна пояснити, з одного боку, більшим використанням його у синтезі стероїдних гормонів, а з іншого – підготовкою матки до імплантації і розвитку ембріона. У 2-й дослідній групі цей показник не змінювався. Збільшення рівня холестерину пов'язане з активізацією метаболічних процесів при сукрільності кролиць, викликаних необхідністю підвищеного синтезу стероїдних гормонів.

Порівняно з контролем, у тварин 1-й та 2-й дослідних групах встановлено збільшення кількості ТГ. Збільшення вмісту триацилгліцеролів сироватки крові зумовлене інтенсивним його використанням в енергетичних і пластичних процесах при підготовці до овуляції та розвитку жовтого тіла. Показник ТГ кролиць 2-ї дослідної групи майже не відрізнявся від показника контролю (1,08 моль/л та 1,03 моль/л відповідно). Доказом активізації обміну ліпідів за введення ліпосомального препарату є підвищений рівень сироваткових ліпідів у кролиць дослідних груп. Так, вміст ЛПНЩ ( $p < 0,05$ ) та ЛПВЩ у 1-й дослідній групі був вищим за відповідні показники контрольної групи, тоді як за введення препарату при осіменінні у кролиць 2-ї дослідної групи рівень ЛПВЩ був наближеним до контрольних значень. Введення

препарату сприяло збільшенню ЗХ та ТГ та їх накопиченню в ЛПНЩ, що викликало підвищення рівня атерогенних фракцій ліпопротеїнів [199].

Встановлені зміни інтенсивності процесів ПОЛ у тканинах репродуктивних органів кролиць після введення досліджуваних препаратів. Так вміст ТБК-активних продуктів та вміст дієнових кон'югатів у гомогенаті ендометрію обох дослідних груп вірогідно знижувався порівняно з контрольною групою ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ). Вміст гідропероксидів ліпідів у матці кролиць 1-ої дослідної груп істотно не відрізнявся від показників контрольної групи, тоді як у 2-й дослідній групі відмічено вірогідне підвищення концентрації гідропероксидів ( $p < 0,05$ ). Наші дослідження підтвердили, що зниження у матці кролиць концентрації як ТБК-активних продуктів, так і дієнових кон'югатів відбувається за рахунок підвищення активності СОД і каталази. Одним з пояснень отриманих результатів є наявність у складі препарату органічних сполук глютамінової кислоти. Наші результати узгоджуються з даними інших авторів [184], згідно з якими застосування глютамінової кислоти сприяє зменшенню вмісту ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів в еритроцитах щурів. Відомо, що глютамінова кислота має виражену антиоксидантну та мембраностабілізуювальну дію завдяки пригніченню пероксидного окислення ліпідів [44]. Ці дані можуть свідчити про інгібувальний вплив глютамінової кислоти на синтез ТБК-активних продуктів, перш за все, малонового діальдегіду і кетонів. Загалом, отримані результати свідчать про прискорення деградації пероксидів за дії глютамінової кислоти.

Надмірне утворення активних форм кисню при заплідненні та вагітності, як наслідок дії фізіологічного стресу, може індукувати також й зміни в протеїнових структурах клітини. Ініціація ОМП є найбільш небезпечною ланкою ушкодження клітин, яка зумовлює інактивацію цитоплазматичних ензимів та мембранних іонних pomp з поступовим впровадженням різноманітних механізмів апоптозу клітин [4]. Водночас, деструкція протеїнів є більш надійним маркером окиснювальних



пошкоджень тканин, ніж продукти ПОЛ, оскільки похідні ОМП є більш стабільними. Результатами досліджень встановлено вірогідне зниження вмісту альдегідних та кетонів похідних окисної модифікації протеїнів у матці кролиць другої дослідної групи порівняно з показниками тварин контрольної групи на 50% і 41% відповідно. Позитивний вплив органічних сполук цинку і мангану на ендogenousні захисні системи та на зниження інтенсивності окисних процесів доведено у інших дослідженнях [315, 431].

При дослідженні активності ензимів антиоксидантного захисту встановлено, що після введення ліпосомального препарату органічних форм мікроелементів за 14 діб до осіменіння активність каталази в ендометрії кролиць 2-ої дослідної групи вірогідно зросла ( $p < 0,01$ ) порівняно до показника контрольної групи. У 1-ій дослідній групі рівень ензиму знаходився на рівні контрольних величин. Активність СОД у ендометрії кролиць обох дослідних груп була вищою порівняно з показником контрольної групи, однак вірогідних різниць між групами не виявлено.

Вміст ТБК-активних продуктів у крові кролиць дослідних груп був вірогідно нижчим ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ), ніж у тварин контрольної групи. Це може свідчити про те, що введення досліджуваних препаратів нормалізує окисні процеси, та не викликає інтенсифікації перекисного окиснення ліпідів, навіть у стресові для організму періоди, а саме запліднення та вагітності. Встановлено зниження вмісту альдегідних і кетонів похідних окисної модифікації білків у крові кролів дослідних груп порівняно з показниками тварин контрольної групи.

Під час визначення активності ензимів АОС у крові, встановлено вірогідне зниження активності каталази у кролиць обох дослідних груп порівняно з показником контрольних тварин ( $p < 0,05$ ). Ймовірно, незначне зниження активності каталази пов'язане з її роллю в інактивації окисних процесів, що виразилось зниженням вмісту продуктів ПОЛ та ОМП. У функціонуванні АОЗ важливу роль відіграє церулоплазмін – купрумвмісна оксидаза крові, яка бере участь у транспорті та утилізації міді,

нейроендокринній регуляції, гемопоезі, регуляції рівня біогенних амінів [365]. Це головний антиоксидант плазми, задіяний у виведенні продуктів розпаду клітин і субклітинних структур із осередку запалення [181]. Встановлено, що у крові тварин 1-ої дослідної групи активність церулоплазміну вірогідно зростала ( $p < 0,05$ ), що свідчить про активацію цієї ланки антиоксидантного захисту у відповідь на введення препаратів.

Проведені дослідження з вивчення впливу органічних препаратів мікроелементів у період запліднення та за 14 днів до осіменіння вказують про позитивний вплив введених органічних сполук на окисні процеси в матці та крові кролематок. Ймовірно, саме органічні форми досліджених мікроелементів сприяють захисту організму від шкідливої дії АФК опосередковано, через активацію ендогенних антиоксидантних ензимів.

Отримані результати підтверджено виробничою перевіркою, проведеною на 90 кролицях парувального періоду. Встановлено, що відсоток сукрильних кролиць 1-ої дослідної групи, яким препарат вводили за 7 днів до синхронізації статевої охоти, становив 86,7 % і був вищим, порівняно з 2-ою дослідною групою – 80%, тварини якої отримували препарат при осіменінні та контролем – 73,3 %.

Введення ліпосомального препарату позитивно вплинуло на кількість отриманих кроленят у гнізді. Так, у кролиць дослідних груп кількість кроленят на 1-шу добу життя була відповідно вищою на 11,4 та 5,2 % порівняно з контрольною групою. Аналогічна тенденція зберігається і щодо життєздатності кроленят. На 20-ту добу життя середня кількість кроленят у гнізді кролиць дослідних груп відповідно перевищувала контрольну групу на 10,8 та 8,2 %, що вказує на позитивний вплив препарату на розвиток кроленят у пренатальний період. Отримані результати досліджень вказують на пролонгований стимулювальний вплив підшкірних ін'єкцій, застосованого комплексного ліпосомального препарату органічних сполук мікроелементів до осіменіння на показники запліднення, кількість отриманого посліду та збереженість молодняку кролів.

Успішний розвиток кролівництва відбувається, насамперед, завдяки ефективному використанню кормової бази та сучасних технологій утримання і годівлі, що дозволяє підвищувати продуктивність тварин і збільшити поголів'я кролів [34, 103]. Для компенсації нестачі мікроелементів в раціоні їх, зазвичай, вводять до корму у неорганічній формі. Однак, така форма сполук недостатньо ефективна, оскільки біологічна доступність мікроелементів із неорганічних солей низька [2]. Тому практичного значення набуває пошук можливості введення біогенних металів у формі хелатних сполук з амінокислотами [92]. Метою наступного етапу наших досліджень було вивчення впливу згодовування кролематкам комплексного ліпосомального препарату органічних сполук мікроелементів у формі препаратів у склад гранульованого комбікорму та додаткових ін'єкцій препарату на перебіг обмінних процесів та показники відтворювальної здатності кролиць в ранній період сукрільності. Препарат «Ліпоорганік» поєднує у своєму складі фармакологічні властивості органічних (глутаматів мангану та цинку, хром-метіоніну) та мінеральних сполук (селеніту натрію) біогенних елементів із чітко визначеним впливом на репродуктивну функцію, які введено до ліпосомальної емульсії та додано до основного раціону.

Порівнянням показників відтворюваної здатності кролематок дослідних груп встановлено, що за додавання до корму ліпосомального препарату мікроелементів за 14 днів до запліднення, а також додатковому введенні кролицям 2-ої дослідної групи ліпосомального препарату при осіменінні, відмічено вищу кількість жовтих тіл вагітності в яєчниках, вірогідно вищу кількість місць імплантацій ( $p < 0,01$ ) та живих ембріонів ( $p < 0,001$ ) порівняно з контрольною групою. У кролиць обох дослідних груп встановлено у 1,5 та 1,9 раза нижчий відсоток доімплантаційної загибелі плодів та у 2 рази нижчий показник постімплантаційних втрат у порівнянні до контрольної групи, що може бути пов'язане з тривалим позитивним впливом додаткового згодовування ліпосомального препарату.

У крові кролиць обох дослідних груп спостерігалось зниження активності АлАТ та АсАТ щодо контрольної групи. Коефіцієнт де Рітиса у крові кролиць контрольної та дослідних груп суттєво не відрізнявся і залишався у межах встановленої норми, що вказує на відсутність в організмі кролематок істотних функціональних порушень [37, 483]. Аналіз результатів досліджень виявив, що вміст загального протеїну знижувався у тварин 2-ої дослідної групи, яким згодовували та додатково вводили препарат у формі ліпосомальної емульсії, порівняно з контрольною групою, що зумовлене інтенсивним його використанням у біосинтетичних процесах, підтвердженням є високі показники приживлення ембріонів та низькі ембріональні втрати. У кролиць цієї групи також відмічено вірогідне зниження активності ЛФ, що зумовлене підвищеною потребою в Кальції та вказує на інтенсивність процесів дефосфорилування гексоз та інших фосфоровмісних сполук у тканинах в ранній період суcriльності, оскільки ЛФ задіяна у процесах фосфорно-кальцієвого обміну в організмі [113].

Результатами досліджень виявлена тенденція щодо зниження вмісту глюкози у кролематок дослідних груп, що зумовлене збільшенням енергетичних потреб, які інтенсифікують дисиміляцію глюкози. Зміни рівня глюкози за суcriльності пов'язані з підвищенням енергоємних біосинтетичних процесів, значною перебудовою гормонального статусу, зокрема, посиленою секрецією інсуліну. Глюкоза також є важливим компонентом ембріотрофу, який є живильним середовищем для зародків [247].

ЛДГ активність у сироватці крові кролиць дослідних груп зростає, зокрема у самиць 1-ї дослідної групи був вірогідно вищим за відповідний показник у тварин контрольної групи ( $p < 0,05$ ). Підвищена ЛДГ активність вказує на активацію гліколітичних процесів в організмі тварин за рахунок введеного препарату, до складу якого входив глютамат цинку, оскільки, як відомо, ЛДГ є цинквмісним ензимом.

Під час вагітності ліпідний обмін супроводжується гіперхолестеринемією і гіперліпідемією на фоні підсиленого утворення ліпідів і повільного їх розпаду. За даними ліпідограми встановлено вірогідно вищий рівень загального холестерину ( $p < 0,05$ ), концентрація триацилгліцеролів ( $p < 0,05$ ) та вміст ЛПВЩ ( $p < 0,05$ ) у сироватці крові кролиць 2-ої дослідній групі, яким за 14 діб до осіменіння додатково до корму вводили ліпосомальний препарат мікроелементів і препарат при заплідненні по відношенню до показника контрольної групи. Отримані результати ліпідного профілю кролиць дослідних груп узгоджуються з даними морфометричних та біохімічних показників. Також інші дослідження показали, що Cr(III) відіграє важливу роль у підтриманні нормального рівня глюкози в крові, зниження рівня холестеролу та тригліцеролів у плазмі, інгібуванні розвитку оксидативного стресу й секреції запальних цитокінів [429].

Зазначені зміни ліпідного обміну дослідних груп пов'язані зі змінами гормонального статусу самок за сукрильності, зокрема корелюють зі зростанням концентрації естрогенів, прогестерону, інсуліну та плацентарного лактогену.

У період відновлення статевої функції у самок, запліднення, росту і розвитку ембріонів встановлена циклічна лабільність гомеостазу метаболічних процесів у репродукції самки. Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів в організмі кролиць у період імплантації підвищується внаслідок посилення інтенсивності енергетичних процесів та утворенням активних форм кисню в організмі за вагітності на фоні оксидативного стресу [249].

Вміст дієнових кон'югатів, які є первинними продуктами перекисного окиснення, за умов застосування ліпосомального препарату у тканині матки та яєчників кролиць дослідних груп знижується. Тоді як вміст гідропероксидів ліпідів, які є продуктами проміжної стадії перекисного окиснення, у тканині матки самок кролів 1-ої дослідної групи був вірогідно

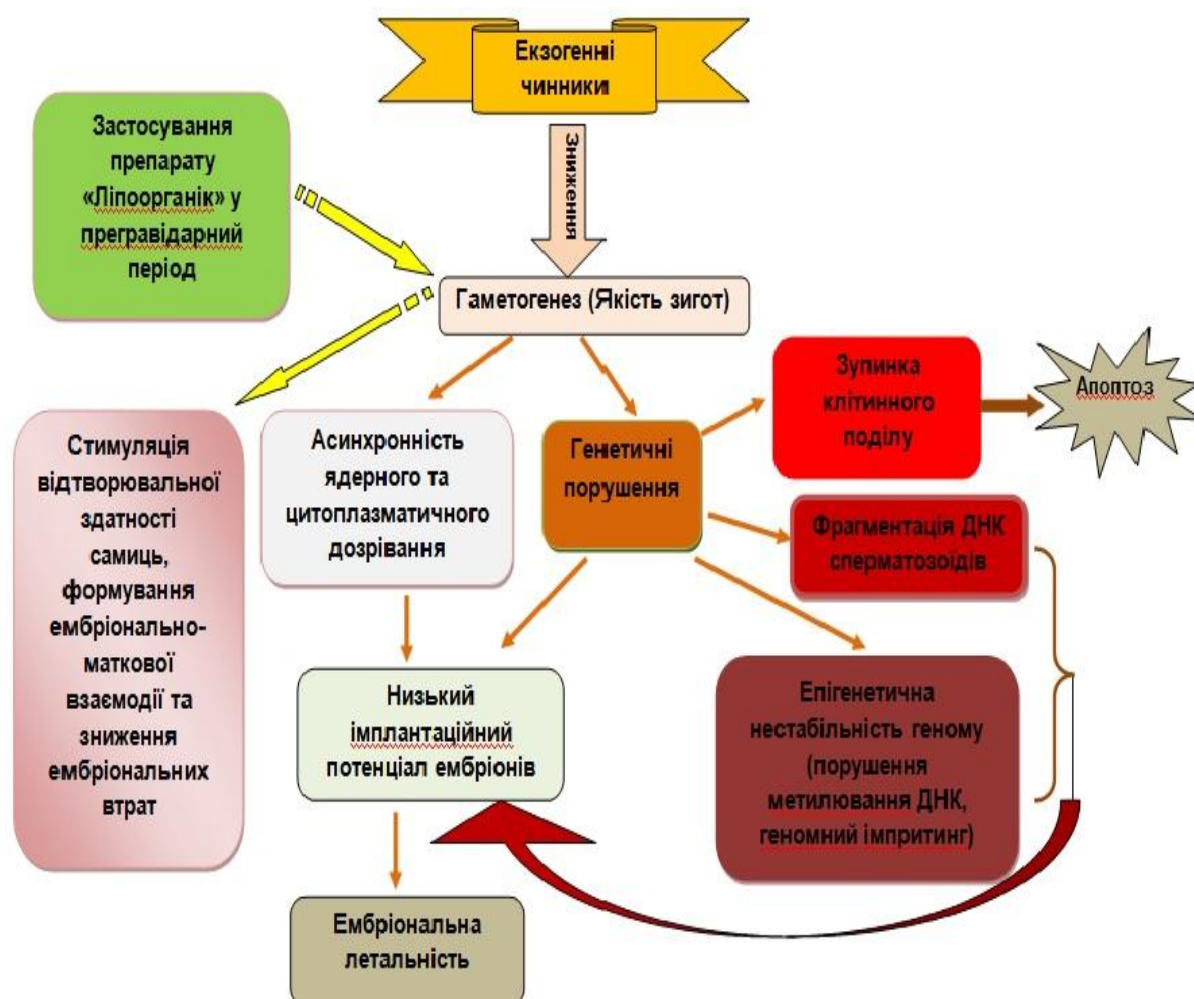
вищим ( $p < 0,01$ ) порівняно з показниками контрольної та 2-ої дослідних груп. Концентрація ТБК-активних продуктів, які є кінцевими продуктами перекисного окиснення ліпідів, у ендометрії кролиць 1-ї ( $p < 0,001$ ) та 2-ї ( $p < 0,01$ ) дослідних груп був вірогідно меншим, ніж у кролиць контрольної групи. Тоді як у тканині яєчника їх вміст вірогідно підвищувався у тварин 1-ої дослідної групи. Отримані результати вказують на інгібувальний вплив досліджуваної добавки мікроелементів та інтенсивність перекисного окиснення ліпідів, а додаткове введення ліпосомального препарату, поряд з тривалим його згодовуванням, проявляє більш суттєвий (2-га дослідна група,  $p < 0,01$ ) вплив вже на початкові стадії перекисного окиснення ліпідів в організмі кролиць у період імплантації. Іншими дослідниками виявлено зниження вмісту ТБК-активних продуктів у печінці щурів у відповідь на добавки їм Хрому піколінату, нікотинату [82].

Результати дослідження стану антиоксидантної системи репродуктивних органів кролиць показали підвищення активності її провідних ензимів АОС. Більш вираженими були зміни антиоксидантних показників у кролиць 1-ої дослідної група, яким додавали до корму ліпосомальний препарат органічних форм мікроелементів до осіменіння. Так, активність каталази у тканинах ендометрію, яєчниках та яйцепроводах вірогідно зросла ( $p < 0,01$ ) щодо показника контрольної групи. СОД активність у гомогенаті ендометрію та тканинах яєчника кролиць 1-ої дослідної групи була вірогідно вищою ( $p < 0,01$ ) порівняно з показником контрольної групи, тоді як рівень ензиму у 2-ій дослідній групі знаходився на рівні контрольних величин. Підвищення активності антиоксидантних ензимів за дії ліпосомального препарату можна пояснити наявністю у складі досліджуваного препарату органічних сполук Цинку та Мангану. Виражену антиоксидантну активність, яка проявляється пригніченням процесів ПОЛ та підвищенням АОС, підтверджують результати інших авторів, які виявили позитивний антиоксидантний ефект Хрому, окремо та у поєднанні з іншими мікроелементами [189, 234].

Дослідження на кролицях показали, що за суcriльності та особливо при лактації в організмі відбувається активація вільнорадикальних процесів, а особливо в період поєднання цих двох фізіологічно напружених для організму самки процесів система АОЗ не встигає повністю відновитися й подолати оксидаційний стрес, що виникає [82]. Особливо враховуючи сучасні технології вирощування кролів з використанням переважно інтенсивного способу при якому поєднують суcriльність з лактацією кролематок та після відлучення кроленят на 30 чи 45 день, самок спаровують відповідно на 25-ту або 30-ту добу лактації, повноцінне забезпечення самок біологічно активними речовинами є особливо актуальним. Ступінь зростання загального рівня енергетичного обміну на початку вагітності найвища, однак у перший період суcriльності інтенсивність обмінних процесів проходить за рахунок використання відкладених в організмі самки поживних речовин у період, що передує осіменінню. На це вказує значна втрата у живій масі самок під час підсисного періоду. На 1-ій стадії мобілізуються захисні сили організму, починаються процеси перебудови системи регуляції. У цей момент опірність організму знижується, відзначається посиленням гемоконцентрації, переважання катаболічних процесів у тканинах. Період раннього ембріонального розвитку є першою стадією адаптаційного процесу, який визначає подальший перебіг суcriльності. Якщо компенсаторні можливості організму не надто вичерпані, то розвивається друга стадія резистентності або адаптації. Тому для попередження виснаження кролиць від окролу до окролу, покращення запліднення та попередження безпліддя, підвищення маси кроленят при народженні та їх природньої резистентності потрібно додатково використовувати БАР, які входять до складу розробленого ліпосомального препарату “Ліпоорганік”.

Отримані у дисертаційній роботі результати дозволяють сформувати фундаментальні уявлення про вплив екзогенних чинників на відтворювальну здатність самиць, детермінованість ембріогенезу характером і ступенем порушень чоловічої та жіночої репродуктивної функції за гаметогенезу

ссавців внаслідок дії екологічних факторів та дисбалансу мікроелементного статусу організму (рис. 4.6).



**Рис. 4.6. Схема біотехнологічних підходів корекції гаметогенезу тварин за впливу екзогенних чинників.**

Чинники антропогенного характеру призводять до напруження адаптаційних резервів організму, що, в однаковій мірі, негативно впливає на відтворювальну функцію самиць та самців.

Викликані антропогенним впливом на організм самців негативні наслідки можуть призводити до зниження рухливості, морфологічних і фертильних властивостей сперматозоїдів і азооспермії (ген *Dazl*), викликати порушення епігенетичної регуляції геному (ДНК-метилювання – ген *Suv39h2*



і ацетилювання гістонів – ген *Hdac1*), що є причиною низької запліднювальної здатності сперматозоїдів і порушень ембріонального розвитку. У відповідь на стрес у тканинах сім'яників миші, крім генів теплового шоку *Hps70i*, *Hsp90aa1*, *Hsp90ab1*, *Danja*, протоонкогену *c-fos*, активується експресія гена *Mdm1*. Ідентифіковано 3-ій транскрипт гену *Mdm1*, що містить додатковий екзон VIIa. Це вказує на те, що у відповіді статевих клітин на вплив стресових факторів задіяні різні сигнальні шляхи, що дозволяє підтримати баланс між виживанням гамет і апоптозом. За незначного пошкодження структури ДНК індукується транскрипція генів, білкові продукти яких беруть участь у зупинці клітинного циклу, що дозволяє клітині репарувати пошкоджені ділянки ДНК або запускати апоптоз клітин.

Водночас у дослідженні *in vivo* при порівнянні тканиноспецифічної експресії гена *Cideb* за теплового стресу встановлено залежність експресії цього гена від ступеню гіпертермії. Показано, що у сім'яниках миші за гіпертермії середнього ступеню (38°C) активність гена *Cideb* не змінюється, тоді як при підвищенні температури до 42°C рівень експресії гена у сім'яниках зростає, а у сперматоцитах виявлено альтернативний сплайсинг-варіант гену *Cideb*, що має важливе значення для розуміння механізмів регуляції сперматогенезу за впливу стресових чинників, які можуть призвести до зниження фертильності.

Успішність запліднення та розвиток ембріону залежить від цілісності ДНК сперматозоїдів. Фрагментація ДНК спермій негативно корелює з розвитком до стадії бластоцисти і суттєво впливає на можливість запліднення. Висока частота пошкодження ДНК, що характеризується одно- або дволанцюговими розривами ДНК; сприяє затримці розвитку ембріона або викликає активацію апоптозу, оскільки тільки 8% пошкоджень можуть бути нейтралізовані відновлюючою здатністю яйцеклітини.

Провідне місце серед антропогенних факторів, що негативно впливають на репродуктивну здатність і перебіг вагітності, посідають важкі метали. Мейоз є дуже чутливим до впливу цих екзогенних чинників, які здатні

порушити послідовність мейотичних перетворень хромосом, індукувати виникнення мутації мітохондріальної ДНК, асинхронність ядерного та цитоплазматичного дозрівання яйцеклітин. Це призводить до формування гамет з генетичними мутаціями, частина з яких зберігає здатність до запліднення, однак, характеризується зниженням імплантаційного потенціалу, що є причиною летальності ембріонів у ранній період вагітності.

Доведено прямий органотоксичний вплив хлоридів кадмію, нікелю і купруму на ембріональні фібробласти і клітини яйцепроводів корів при тривалому надлишковому їх надходженні, тоді як за короткотривалого впливу високих концентрацій сполук цих металів зниження проліферативної активності клітин ембріональних фібробластів має адаптатичний характер. Це дозволяє з'ясувати особливості перебігу гаметогенезу у відповідь на різні види стресу та об'єктивно визначати адаптаційні та дезадаптаційні зміни репродуктивної системи для внесення своєчасної корекції на всіх етапах розвитку організму, а також у період установаження та перебігу вагітності.

Підвищений рівень токсикантів може потенціювати аліментарний дефіцит есенціальних мікроелементів, що призводить до дисбалансу у функціонуванні гіпоталамо-гіпофізно-яйникової системи, порушення ендокринного і метаболічного профілів організму, функціональній активності яєчників, дозрівання фолікулів та гальмуванням овуляції. Перебіг вагітності за недостатньої кількості чи надлишку мікроелементів може призвести до зриву адаптаційних механізмів та змінити перебіг фізіологічних взаємин між материнським організмом і плодом, що формує ризик виникнення ускладнень під час вагітності.

Доведено позитивний вплив глютамату цинку і мангану у формі ліпосомальних препаратів на репродуктивну систему самиць (підвищення морфо-функціонального стану та масометричних параметрів яєчників) та ембріогенез щурів, зниження до- та постімплантаційної смертності та корекцію ліпідного обміну.

Нутрієновий дисбаланс, низькокалорійна дієта, токсиканти здатні порушувати геномний імпринтинг під час гаметогенезу за вагітності, перепрограмувати епігенетичну інформацію плоду, детермінуючи розвиток незворотніх змін його фенотипу. Отримані дані вказують про доцільність використання хелатних сполук хрому, зокрема, з метіоніном, який задіяний у фолатному циклі, підтримці гомеостазу метильних груп для регуляції енергетичного обміну за вагітності та посиленні адаптаційно-компесаторної здатності самиць за наявності тригерів.

Для нормалізації відтворювальної здатності самиць та попередження негативної дії екопатологічних чинників на організм, розроблено комплексний ліпосомальний препарат органічних сполук мікроелементів, біопротекторна дія яких щодо активації імплантаційної та ембріональної здатності, посилення ембріонально-маткової взаємодії доведена у експериментальних дослідженнях. Ефективність біотехнологічного способу стимуляції відтворювальної здатності самиць підтверджена результатами виробничих перевірок та апробації препарату «Ліпоорганік».

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення наукової проблеми із встановлення особливостей раннього ембріонального розвитку тварин за дії екзогенних чинників. Наукове завдання вирішене за допомогою сучасних біотехнологічних методів досліджень на модельних системах *in vitro* та *in vivo* з вивченням гаметогенезу у ссавців, імплантаційну здатність, особливостей ембріогенезу зумовлених впливом фізіологічних, генетичних, ембріональних, аліментарних факторів. Експериментально обґрунтовано застосування комплексного препарату органічних сполук мікроелементів «Ліпоорганік» для забезпечення організму самки мікронутрієнтами під час преґравідарного етапу та у період гестації.

На основі отриманих результатів сформульовано такі висновки:

1. Співкультивування деконсервованих доімплантаційних ембріонів миші на фідерному моношарі клітин яйцепроводів кролиць підвищує на 6,38–6,55 % їхній розвиток до стадії бластоцисти.
2. Запропоновано надшвидку твердоповерхневу вітрифікацію мікрокрапель у середовищі з 35 % ЕГ та 12 % ДМСО для заморожування зигот на стадії 2-ох пронуклеусів.
3. Створено просторову клітинну систему на основі природних та полімерних похідних та проведено скринінг біосумісності отриманих наноповерхонь на стандартизованих клітинних лініях та первинних репродуктивних культурах клітин. Встановлено високу життєздатність та ріст клітин на поверхнях, модифікованих полімерними наношарами з прищепленими макроланцюгами декстрану, АПТЕС (3-амінопропіл(триетокси)силан) та альбуміну, що підтверджує можливість використання модифікованих наноповерхонь для формування об'ємних клітинних моделей наближених до умов *in vivo*.

4. Ко-культивування ооцит-кумулюсних комплексів на просторово-організованих на основі біогелю системі клітин ендометрію підвищує на 16,7 % дозрівання ооцитів до стадії метафази-II і збільшує на 17,8 % розвиток 2-ох клітинних ембріонів миші до стадії бластоцисти, порівняно з моношаром клітин ендометрію.

5. Культивування ранніх ембріонів миші *in vitro* у просторовій системі клітин яйцепроводів кролиць, модифікованих альбуміном, а особливо нанопокриттям з біогелем, позитивно впливає на життєздатність і розвиток зигот, сприяє дробленню зародків, компактизації, диференціації клітин, знижує на 13,3 % кількість дегенерованих ембріонів та підвищує хетчинг бластоцист, порівняно з моношаровою культурою клітин.

6. Гіпертермія (42°C, 30 хв) призводить до активації генів теплового шоку в печінці та сім'яниках. Крім генів раннього сперматогенезу *mDazl* (ген делеції при азооспермії), *Mdm1* (murine double minute 1, кодує ядерний протеїн, регулює дуплікацію центриолей), виявлено високий рівень генів гістонової деацетилази *Hdac4* та метилтрансферази *Suv39h2*, які задіяні у епігенетичному репрограмуванні геному у чоловічих статевих клітинах, що впливає на запліднюючу здатність та ембріональний розвиток.

7. Встановлено експресію гена *Cideb* (індукуючий смерть клітини DFFA-подібний ефектор b) та його тканинну специфічність за дії гіпертермії у миші. Рівень експресії гена *Cideb* у тканинах печінки, кишківника і нирки посилюється, а в шлунку та сім'яниках миші знижується. У сперматоцитах миші за дії гіпертермії середнього ступеня ідентифіковано нову ізоформу транскрипту гена *Cideb*.

8. Найбільш виражений цитотоксичний вплив та функціональну активність ембріональних фібробластів та клітин яйцепроводів корів проявляє кадмію хлорид і купруму хлорид, а найменший – нікелю хлорид. Глутамати мангану і цинку, на відміну від мангану (II) сульфату і цинку сульфату, у досліджуваних концентраціях не мають цитотоксичного впливу на клітини лінії NIN3T3 впродовж їх 72-годинного культивування.

9. Підшкірне введення самкам щурів глютамату цинку і мангану у ліпосомальній формі збільшує масометричні параметри яєчників, число жовтих тіл вагітності та кількість живих плодів. Це відбувається за рахунок зниження на 7,06–7,29 % передімплантаційної та на 5,39–6,83 % постімплантаційної смертності, а також позитивно впливає на корекцію ліпідного обміну.

10. Створено комплексний ліпосомальний препарат “Ліпоорганік“, що поєднує органічні та мінеральні сполуки біогенних елементів і підвищує відтворювальну здатність, ембріогенез, морфо-функціональний стан різних систем та обмінні процеси в організмі у підготовчий до запліднення та ранній ембріональний період. Підшкірне введення кролицям цього препарату за 14 діб до осіменіння знижує доімплантаційну загибель плодів, підвищує вміст холестеролу та ЛПНЩ, а також знижує у крові вмісту альдегідних і кетонових похідних окисної модифікації протеїнів (ОМП<sub>370</sub> та ОМП<sub>430</sub>), знижує вміст дієнових конюгатів у ендометрії та вміст ТБК-активних продуктів у крові та матці кролиць.

11. Застосування препарату “Ліпоорганік“ за осіменіння кролиць знижує у 2,3 раза постімплантаційну летальність та у 2 раза кількість резорбцій, сприяє корекції прооксидантно-антиоксидантної рівноваги – зниженню ТБК-активних продуктів і вмісту альдегідних похідних окисної модифікації протеїнів (ОМП<sub>370</sub>) у крові, зниженню у матці вмісту дієнових кон’югатів, ОМП<sub>370</sub> та ОМП<sub>430</sub>, ТБК-активних продуктів, вірогідному зростанню активності каталази.

12. Підшкірне введення ліпосомального препарату “Ліпоорганік“ за осіменіння у поєднанні зі його згодовуванням проявляє суттєвий вплив на репродуктивну систему кролиць: вірогідно підвищується кількість місць імплантацій та живих ембріонів, знижується в 1,9 раза доімплантаційна та 2,3 раза постімплантаційна летальність.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для оптимізації дозрівання ооцитів та ембріонів поза організмом рекомендовано використовувати об'ємну клітинну систему на основі модифікованих наноповерхонь декстраном, 3-амінопропіл(триетокси)силан (АПТЕС), альбуміном та біогелем.

Щоб підвищити ефективність отримання ембріонів ссавців запропоновано дорощувати ооцити та культивувати ембріони *in vitro* на об'ємній системі клітин яйцепроводу та ендометрію на основі біогелю та нанопокритті з альбуміном.

Рекомендовано підшкірно вводити кролицям препарат «Ліпоорганік» за 14 днів до осіменіння або при осіменінні у дозі 1,5 мл/кг, що посилює метаболічні процеси, покращує відтворювальну здатність самок кролиць, підвищує імплантаційну здатність, знижує до- і постімплантаційну смертність плодів та дозволяє одержати більшу кількість кроленят.

Ці рекомендації наведені в методичних рекомендаціях «Отримання функціоналізованих наноповерхонь для культивування клітин, ооцит-кумулюсних комплексів та ембріонів тварин», навчально-методичному посібнику «Клітинні культури і можливості їх використання в ембріональній біотехнології», Технічних умовах України (ТУ У) 21.2-30995014-00:2018 Препарат «Ліпоорганік», а також в патентах України на корисну модель (№56695, № 105740).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Агбалян Е. В. Характеристика генотоксических и цитотоксических эффектов малых доз кадмия / Е. В. Агбалян, Е.В. Шинкарук // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2015. — № 6-3. — С. 427-431; URL: <https://www.applied-research.ru/ru/article/view?id=6918>.
2. Агій В. М. Хелатні та мінеральні сполуки у годівлі молодняку ВРХ / В. М. Агій // Науково-технічний бюлетень. — 2011. — Вип. 12, №1, 2. — С. 107-111.
3. Айламазян Є. К. Ко-культивирование эмбрионов человека с эндомерием: оптимизация экстракорпорального оплодотворения / Є. К. Айламазян, В.О. Дурнов, В.О. Полякова, М.Н. Судалина, И. М. Кветной // Журнал акушерства и женских болезней. — 2012. — Том.LXI, вып. 4. — С. 16-22.
4. Андрійчук А. В. Вплив тренінгу на показники оксидативного стресу у спортивних коней голштинської породи / А. В. Андрійчук, І. В. Ткачова, Г. М. Ткаченко, Н. М. Кургалюк, І. О. Матюха // Біологія тварин. — 2013. — Т.15, № 1. — С. 9-18.
5. Антоняк Г. Л. Біологічна роль цинку в організмі людини і тварин / Г. Л. Антоняк, О. В. Важненко, В. Д. Бовт [та ін.] // Біологія тварин. — 2011. — Т. 13, № 1–2. — С. 17–31.
6. Антоняк Г. Л. Кадмій в організмі людини і тварин. Вплив на репродуктивну систему / Г. Л. Антоняк, Н. О. Бабич, Л. П. Білецька, Н. Є. Панас // Studia Biologica. — 2011. — Т. 5, № 2. — С. 141-152.
7. Антоняк Г. Л. Кадмій в організмі людини і тварин. II. Вплив на функціональну активність органів і систем / Г. Л. Антоняк, Н. О. Бабич, Л. П. Білецька, Н. Є. Панас, Ю. В. Жиліщич // Біологічні студії. — 2010. — Т. 4, № 3. — С. 125–136.



8. Антоняк Г. Л. Утворення активних форм кисню та система антиоксидантного захисту в організмі тварин / Г.Л. Антонюк, Н.О. Бабич, Л.І. Сологуб, В.В. Снітинський // Біологія тварин. — 2000. — Т.2, №2. — С. 34-43.
9. Антоняк Г.Л. Біологічна роль купруму та купрумвмісних білків в організмі людини і тварин / Г.Л. Антоняк, О.В. Важненко, Н.Є. Панас // Науковий вісник Львівської НАУВМБТ ім. С.З.Гжицького. — 2011. — Т. 13, № 2 (48), ч.1. — С. 322–332.
10. Арустамян О.М. Влияние соединений кадмия на организм человека / О.М. Арустамян, В.С. Ткачишин, А.Ю. Алексейчук // Медицина неотложных состояний. — 2016. — №7. — С. 109–114. DOI: <http://dx.doi.org/10.22141/2224-0586.7.78.2016.86103>.
11. Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування (за ред. Р.С. Стойки). К.: Наук. думка, 2017.
12. Баглай О. М. Система антиоксидантного захисту та перекисне окислення ліпідів організму тварин / О. М. Баглай, С. Д. Мурська, Б. В. Гутий, Д. Ф. Гуфрій // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. — 2011. — Том. 13, № 4(50). Частина 2. — С. 3-11.
13. Бакулин И. Г. Оценка элементного статуса в определении нутриентной обеспеченности организма. Значение нарушений элементного статуса при различной патологии / И.Г. Бакулин, В.Г. Новоженев, М.А. Иванова, К.Д. Малабаев // [Электронный ресурс]. — Режим доступа: [http://www.vitamax.ru/nauchny/opyt/2005\\_opit\\_01\\_bakulin.doc](http://www.vitamax.ru/nauchny/opyt/2005_opit_01_bakulin.doc)
14. Бащенко М. І. Сучасний стан та перспективи застосування біотехнологій у тваринництві / М. І. Бащенко., С. І. Ковтун // Таврійський наук. вісник. — 2012. — Том 2(II), №78. — С. 45-49.
15. Бевзо В. В. Вплив тривалого введення глютамату натрію на рівень деяких метаболітів азотистого обміну в сироватці крові щурів / В. В. Бевзо //

- Вісник проблем біології і медицини. — 2017. — Вип. 1 (135). — С. 83-86.  
 Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm\\_2017\\_1\\_16](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm_2017_1_16).
16. Безручко Н. В. Металлотионеины: взаимосвязь с окислительной модификацией белков и липидов, методы мониторинга / Н. В. Безручко, Г. К. Рубцов, О. М. Григорьева // Вестник Томского государственного педагогического университета. — 2015. — 11 (164). — С. 161-168.
  17. Белецкая Э. Н. Влияние цинка на репродуктивную функцию экспериментальных животных / Э. Н. Белецкая, Н.М. Онул // Микроэлементы в медицине. — 2014. — №15 (2). — С. 22-28.
  18. Бессалова Е. Ю. Физиологические и структурные методы оценки морфофункционального статуса яичников млекопитающих /Е.Ю. Бессалова // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. — 2006. — Т. 5, № 3. — С. 85-90.
  19. Білецька Е. М. Статеві-вікові особливості мікроелементного статусу населення промислового регіону / Е.М. Білецька, Н.М. Онул, Л.А. Михайлова, Т.В. Красота // Гігієна населених місць. — Київ, 2011. — Вип. 58. — С. 361-366.
  20. Білецька Е.М. Вміст важких металів в індикаторних біосередовищах фертильних та інфертильних чоловіків, які мешкають на урбанізованих територіях / Е.М. Білецька, В.П. Стусь, Н.М. Онул, М.Ю. Поліон // Медичні перспективи. — 2015. — Т. XX, №1. — С. 111-116.
  21. Білецька Е.М. Гігієнічні пріоритети оцінки техногенної контамінації довкілля як ризик-фактора для здоров'я людини – розвиток проблеми школи / Е.М. Білецька, Н.М. Онул, Т.А. Головова [та ін.] // Гігієнічна наука та практика: сучасні реалії: матеріали XV з'їзду гігієністів України. — Львів, 2012. — С. 446-448.
  22. Білецька Е.М. Сучасний вектор дослідження проблем репродуктивного здоров'я чоловіків промислового регіону / Е.М. Білецька, Н.М. Онул, Т.А. Головова [та ін.] // Довкілля і здоров'я: матеріали наук.-практ. конф. — Тернопіль: ТДМУ «Укрмедкнига». — 2014. — С. 7-8.

23. Бінкевич В.Я. Біохімічні функції хелатних з'єднань мікроелементів у організмі тварин / В.Я. Бінкевич, Б.В. Гутий, Л.Є. Микитин, Ф. Новотні, Б. Лешо // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. — 2012. — Т. 14 № 2 (3). — С. 3-7.
24. Біотехнологічні і молекулярно-генетичні основи відтворення тварин [Текст] / В. А. Яблонський, С. П. Хомин, В. І. Завірюха [та ін] ; заг. ред. В. А. Яблонського, О. І. Сергієнка, Р. С. Стойка. - Л. : Афіша, 2009. - 218 с.
25. Бойко Н. І., Скиба О. О., Цвіліховський М. І. Ефективність профілактики порушень мінерального обміну у сухостійних корів із застосуванням мінералів і мікроелементів // II конф. проф.-викл. складу і асп. ННІ вет. медицини, якості і безпеки продукції АПК НАУ: Тези доп. — К. — Наук. світ. — 2003. — С. 12–13.
26. Бойко М. І. Роль цинку в функціонуванні репродуктивної системи [Електронний ресурс] / М. І. Бойко, О. М. Бойко; ДНУ «Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини» Державного управління справами, м. Київ. — Режим доступу: <http://med-dovidka.com.ua/content/view/2325/>.
27. Большова О. В. Мікроелементи та здоров'я дитини: дефіцит есенціальних мікроелементів у дітей і підлітків (сучасний стан проблеми) [Електронний ресурс] / О. В. Большова, В. Г. Пахомова // Інф. Блок «Страна врачей», 2019. — Режим доступу: <https://medstrana.com/articles/3262/>
28. Большова О. В. Цинк і його значення для росту та статевого розвитку дітей / О. В. Большова, В. Г. Пахомова // Клінічна ендокрин. та ендокрин. хірургія. — 2011. — 3(36). — С. 77-82.
29. Бороян Р. Г. Клиническая фармакология для акушеров-гинекологов. М.: Практическая Медицина, 2007. 176 с.
30. Боярский К. Ю. Факторы, определяющие овариальный резерв женщины (обзор литературы) / К. Ю. Боярский, С. Н. Гайдуков, А. С. Чкуасели // Журнал акушерства и женских болезней. — 2009. — Т. 58, № 2. — С. 65–71.

31. Бугров О. Д., Хмельков М. В. Рання доімплантаційна ембріональна смертність у телиць та корів / О. Д. Бугров, М. В. Хмельков // Науково-технічний бюлетень. — 2015. — № 113. — С. 52-57.
32. Буркат В. П. Сучасна біотехнологія у тваринництві / В. П. Буркат, С. І. Ковтун // *Biotechnologia Acta*. — 2008. — Т. 1, № 3. — С. 7-12.
33. Вайсерман О. М. Епігенетичне "програмування" залежних від віку захворювань / О. М. Вайсерман, Л. В. Мехова, В. П. Войтенко // Пробл. старения и долголетия. — 2014. — 23, № 3. — С. 215—239
34. Вакуленко І. С. Відродження галузі кролівництва в Україні / І. Вакуленко, Д. Микитюк, І. Лучин // Тваринництво сьогодні. — 2013. — № 6. — С. 65–67.
35. Вакуленко І. С. Ефективність застосування біологічно-активних компонентів на підвищення статевої активності кролематок / І. С. Вакуленко, Т. М. Очковська, В. С. Петраш, Т. М. Данілова // Науково-технічний бюлетень. — 2010. — Вип. 102. — С. 34–40.
36. Венцківський Б. М. Вміст важких металів у біологічних субстратах системи «мати – плацента – плід» за синдрому затримки розвитку плоду / Б. М. Венцківський, С. В. Осадчук // Ліки України. — 2010. — № 3. — С. 38-41.
37. Ветеринарна клінічна біохімія / В.І. Левченко, В.В. Влізло, І.П.Кондрахін та ін.; За ред. В.І. Левченка і В.Л. Галяса. — Біла Церква, 2002. — 400 с.
38. Витязева И. И. Влияние ожирения на индекс фрагментации сперматозоидов и сходы программ ЭКО / И. И. Витязева, М.В. Алташина, Т. В. Мун, Е. А. Трошина // Проблемы эндокринологии. — 2015. — 61(5). — С. 48-55.
39. Віщур О. І. Вплив вітамінно-мінерального комплексу «Оліговіт» на показники фагоцитозу нейтрофілів крові у тільних корівпервісток та їхніх телят О. І. Віщур, Д. І. Мудрак, Н.А. Брода, М. І. Рацький, І. О. Матюха, О. Слипанюк, Т. М. Супрович Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. — 2015. — Том 17, № 3 (63). — С. 3-8.

40. Владимиров Ю. А. Биологические мембраны и незапрограммированная смерть клетки / Ю. А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. Биология. — 2000. — № 9. — С. 11–16.
41. Влізло В. В. Лабораторні методи досліджень у біології тваринництві та ветеринарній медицині [Текст] : довідник / В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.; За ред. В.В. Влізла. — Львів: СПОЛОМ, 2012. — 764 с.
42. Влізло В.В. Біохімічні основи нормування мінерального живлення великої рогатої худоби. Мікроелементи / В.В. Влізло, Л.І. Сологуб, В. Г. Янович та ін. // Біологія тварин. — 2006. — Т. 8, № 1-2. — С. 43–54.
43. Гаврилов В. Б. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой / В. Б. Гаврилов, Л. М. Мажуль // Вопр. мед. химии. — 1987. — Т. 33, № 1. — С. 118–122.
44. Галимская Е. В. Обзор препаратов нейроаминокислот / Е. В. Галимская, М. А. Демидова // Врач и аспирант. — 2009. — № 6 (33). — С. 457–461.
45. Гапєєнко Д. Д. Комбінована дія іонізуючого випромінювання, солей міді та нікелю на морфофункціональні характеристики клітин *in vitro* / Д. Д. Гапєєнко, Г. Й. Лавренчук // Ядерна фізика та енергетика. — 2014. — Т. 15, № 3. — С. 298-305. — Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/yadf\\_2014\\_15\\_3\\_14](http://nbuv.gov.ua/UJRN/yadf_2014_15_3_14).
46. Герасимов И.Г. Оценка жизнеспособности клеток по их морфометрическим параметрам на примере культивируемых фибробластов / И. Г. Герасимов, А. Г. Попандопуло // Цитология. — 2007. — Том 49, №3. — С. 204-209.
47. Гжегоцкий М.Р. Влияние меди, цинка, кадмия и свинца на вероятность развития угрозы прерывания беременности у женщин / М.Р. Гжегоцкий, Н.В. Суходольская // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. — 2014. — № 1. — С. 43–49.

48. Гложик І. З. Активність ферментів глутатіонової системи у жуйних тварин в залежності від фізіологічного стану та вмісту цинку в раціоні / І. З. Гложик, В. В. Снітинський, Р. Я. Іскра // Науковий вісник Львівської академії ветеринарної медицини імені С. З. Ґжицького. — 2003. — Т. 5, № 2. — С. 28–31.
49. Гнатейко О.З., Лук'яненко Н.С. Екогенетичні аспекти патології людини, спричиненої впливом шкідливих факторів зовнішнього середовища / О.З. Гнатейко, Н.С. Лук'яненко // «Здоров'я дитини». — 2007. — 6(1).
50. Гольцев А. Н. Использование нанокompозитных покрытий в технологиях культивирования мультипотентных мезенхимных стромальных клеток / А. Н. Гольцев, И. В. Рассоха, Т. Г. Дубрава, Л. В. Останкова, М. В. Останков, Е. А. Гордиенко, В. И. Сафонов А. В. Зыкова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2013. — Том VIII, № 1. — С. 46-50.
51. Гольцев А. Н. Теоретическое обоснование целесообразности и перспективности разработки новых методов культивирования стволовых клеток с использованием нанокompозитных покрытий [Текст] / А. Н. Гольцев, И. В. Рассоха // Збірник наукових праць "Вісник НТУ "ХПІ" : Хімія, хімічна технологія та екологія. — 2010. — №47.
52. Гончар О. Ф. Сучасний стан та перспективи розвитку галузі кролівництва в Україні / О. Ф. Гончар // Кролиководство и звероводство. — 2014. — № 10. — С. 4.
53. Горбунов Л.В. Обеспечение условий сопоставимости результатов криоконсервирования эмбрионов млекопитающих / Л.В. Горбунов, Е.А. Годиенко // Проблемы криобиологии. — 2011. — Т.21, № 2. — С. 162–172.
54. Гордієнко В.В. Особливості накопичення кадмію в організмі щурів різного віку за тривалої експозиції солі металу в дозах малої інтенсивності / В. В. Гордієнко // Клінічна та експериментальна патологія. — 2015. — Т. 14, № 1. — С. 40-43.

55. Горго Ю. П. Аналіз факторів впливу на функціональні стани людини в умовах антарктичної експедиції / Ю. П. Горго, Т.Г. Мірошник, В.Б. Богданов, Н.В. Харковлюк, В.М. Ільїн // Український антарктичний журнал. — 2003. — № 1. — С. 123-128.
56. Горожанская Э. Г. Свободнорадикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых заболеваниях / Э. Г. Горожанская // Клиническая лабораторная диагностика. — 2010. — № 6. — С. 28–44.
57. Горюхина О. А. Культивирование клеток на микросферах, покрытых гистонами / О. А. Горюхина., С. В. Мартюшин, М. И. Блинова, Г. Г. Полянская, О. А. Черепанова, Г. П. Пинаев // Цитология. — 2010. — Том 52. № 1. — С. 12-23.
58. Гречаніна Ю.Б. Вивчення впливу поліморфізмів мтДНК та поліморфних варіантів генів C677T MTHFR, A66G MTRR на клінічні прояви мітохондріальних дисфункцій: дис. на здобуття наук. ступеня док. мед. наук.: спец. 03.00.15 «генетика». / Гречаніна Ю.Б., Львів, 2012. — 337 с.
59. Грибан В.Г. Застосування мікроелементів в раціонах відгодівельного молодняку великої рогатої худоби української м'ясної породи (методичні рекомендації) / В.Г. Грибан, М.І. Соловійов, Д.Ф. Милостива — Дніпропетровськ, 2015. — 16 с.
60. Гринцова Н. Б. Функціональний стан гіпофізарно-яєчникової системи статевозрілих щурів за умов довготривалого впливу солей важких металів та негормональної корекції / Н. Б. Гринцова, А. М. Романюк // Scientific Journal «ScienceRise:Biological Science». — 2017. — №3(6). — С. 4- 7.
61. Грунтковський М. С. Стимуляція відтворювальної здатності корів препаратом «Нановулін ВРХ» / М. С. Грунтковський // Вісник Сумського національного аграрного університету. — 2014. — № 2/1 (24). — С. 204–208.
62. Давыдова Г.А. Изучение влияния полианионных биологически активных веществ на свойства фторполимерной биосинтетической матрицы /

- Г. А. Давыдова, И. И. Селезнева, Б.К. Гаврилюк // Вопросы биологической, медицинской и фармакологической химии. Москва. — 2004. — №2. — С. 11-14.
63. Дакс А. А. Роль различных Е3- убиквитинлигаз в регуляции активности онкосупрессора p53 / А. А. Дакс, Д. Мелино, Н. А. Барлев // Цитология. — 2013. — 55(10). — С. 673-687.
64. Дейнека С. Є. Токсиколого-гігієнічні аспекти застосування методу культур клітин при комплексному вивченні сполук металів та оцінці засобів цитопротекції / С. Є. Дейнека - Київ,-2000.-34 с, 2000 автореф. дис. на здобуття наук. ступ. Докт. Мед. наук. — 14.02.01 – гігієна.
65. Денисенко М. В. Динамика формирования фолликулярного резерва яичников / М. В. Денисенко, М. А. Курцер, Л. Ф. Курило // Андрология и генитальная хирургия. — 2016. — № 2, том 17. — С.20-28 DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-2-20-28.
66. Дзіцюк В. Трансгенез у тваринництві - перспективи і проблеми / В. Дзіцюк, М. Себа // Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. н.-д. контрол. ін-ту ветпрепаратів та корм. добавок. — 2012. — Вип. 13, N 3/4. — С. 420-423.
67. Дзіцюк В.В. Аналіз ооцит-кумуляусних комплексів кіз та параметрів їх дозрівання в умовах *in vitro* / В.В. Дзіцюк, А.Б. Зюзюн, О.С. Осипчук //Вісник аграрної науки. — 2015. —№ 12. — С. 39-42.
68. Доронин Ю.К., Сенечкин И.В., Хилькевич Л.В., Курцер М.А. Варианты и вариабельность дробления эмбрионов человека / Ю. К. Доронин, И. В. Сенечкин, Л. В. Хилькевич, М. А. Курцер // Acta Naturae. — 2016. — Т. 8, № 3. — С. 178-187.
69. Дослідження фрагментації ДНК та ензиму PARP-1 репарації ДНК у людських сперматозоїдах залежно від їхнього морфофункціонального стану / В. О. Камінський, Б. Р. Стойка, Р. С. Стойка // Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія. - 2007. - № 4. - С. 10-18.



70. Дрогомирецька І.З. Імунотоксичність нікелю та його сполук / І. З. Дрогомирецька, І. В. Мазепа, М. А. Мазепа // Современные проблемы токсикологии. — 2009. — 3-4. — С. 25-31.
71. Дубинина Е. Е. Окислительный стресс и окислительная модификация белков / Е. Е. Дубинина // Med.chemistry. — 2001. — № 2. — Р. 5-12.
72. Дудченко Т. М. Життєздатність клітин у культурі при спільній дії важких металів та радіації / Т. М. Дудченко, Г. Й. Лавренчук, Я. І. Серкіз, В. А. Зінченко // Биополимеры и клетка. — 2000. — Т. 16, № 5. — С. 409–412.
73. Евдонин А. Л. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции / А. Л. Евдонин, Н. Д. Медведева // Цитология. — 2009. — Т. 51. № 2. — С. 130–137.
74. Експериментальне вивчення ембріотоксичної дії лікарських засобів (методичні рекомендації). — К. 2000. — 40 с.
75. Епанчинцева Е.А. Параметры эякулята у пациентов с абдоминальным ожирением / Е. А. Епанчинцева, В. Г. Селятицкая, Ю. И. Шеина // Андрология и генитальная хирургия. — 2015. — №1. — С. 88-93.
76. Жабин С. Г. Современные представления о созревании сперматозоидов в придатке яичка / С. Г. Жабин, С. Б. Артифексов, В. М. Нагайцев та ін. // Проблемы репродукции. — 2010. — № 2. — С. 66–73.
77. Затуловская Ю. А. Роль надпочечников в регуляции метаболизма меди в печени: дис.. на здобуття ступ. канд.. біол. наук за спец. 03.01.04. — біохімія / Затуловская Ю. А., 2014, Санкт-Петербург, 147 с.
78. Зиновьева Н. А. Трансгенные сельскохозяйственные животные: современное состояние исследований и перспективы / Н. А. Зиновьева, Н. А. Волкова, В. А. Багиров, Г. Брем // Экологическая генетика. — 2015. — Том XIII, № 2. — С. 58-76.
79. Зюзюн А. Б. Цитоморфологічні особливості ооцит-кумулюсних комплексів та ембріонів сільськогосподарських тварин за умов

культивування *in vitro*: дис.. на здобуття ступ. канд.. біол. наук за спец. 03.00.20. – біотехнологія / Зюзюн А. Б., 2016, с. Чубинське Київської обл., 176 с.

80. Ильин Д.В. Разработка технологий получения аспарагинатов металлов – субстанций для производства БАД / Д.В. Ильин, Р.В. Краснова, И.З. Ахметов, В.В. Судок // Микроэлементы в медицине. — 2012. — 13(4). — С. 49-51.

81. Іскра Р. Я. Амінотрансферазна та дегідрогеназна активність і вміст гормонів в організмі щурів за дії сполук хром / Р.Я. Іскра // Вісник Київськ. нац. універ. ім. Т. Шевченка. Біологія. — 2013. — 63. — С. 13–16.

82. Іскра Р. Я. Антиоксидантний та імунний захист організму кролематок за дії хлориду хрому / Р. Я. Іскра // Вісник Луган. нац. ун-ту ім. Т. Шевченка. Мед.-біологія науки. — 2012. — № 17. — С. 63-68.

83. Іскра Р. Я. Біохімічні механізми дії хрому в організмі людини і тварин / Р. Я. Іскра, В. Г. Янович // Ukr. Biochem. J. — 2011. — Том 83, № 5. — С. 5-12.

84. Іскра Р.Я. Особливості функціонування глутатіонової ланки антиоксидантного захисту і ліпідного обміну у вагітних самок щурів за дії хром цитрату / Р. Я. Іскра // Biol. Stud. — 2013. — 7(1). — С. 71–80. DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.0701.276>

[www.http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology](http://www.http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology).

85. Іскра Р.Я. Хром у живленні тварин / [Р.Я. Іскра, В.В. Влізло, Р.С. Федорук, Г.Л. Антоняк] // – К. : Аграрна наука, 2014.– 310 с.

86. Каминская И. А. Адаптивный ответ в клетках человека с различной способностью репарировать повреждения ДНК: автореф. канд. дис. Москва, 1999. — С. 23.

87. Камышников В.С. Определение диеновых конъюгатов и диенкотонов // Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. — 2000. — 2. — С. 206.

88. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – Т 1. – Минск.: Из-во "Беларусь", 2000. – С. 90-128.
89. Кантидзе О. Л. Роль клеточного ядра и эпигенетических факторов в комплексном ответе эукариотической клетки на стресс: дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук: спец. 03.01.03 «молекулярна біологія» / Кантидзе О. Л. Москва, 2016. – 214 с.
90. Качинський А.Б. Екологічна безпека України: системний аналіз перспектив покращення / А.Б. Качинський. – Київ: НІСД, 2001. – 312 с.
91. Кашин А.С. Особенности действия экотоксикантов на репродуктивные функции продуктивных животных / А.С. Кашин, А.В. Оспищев, М.С. Москвитина // Проблемы современной аграрной науки: материалы Междунар. заочной конференции. – 2008. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.kgau.ru/new/all/konferenc/01/>.
92. Кебец Н. М. Синтез смешаннолигандных комплексов металлов с витаминами и аминокислотами и изучение их биологических свойств на животных : автореф. дис. докт. биол. наук. /Н. М. Кебец. — М., 2006. — 35 с.
93. Клещев М.А. Сперматогенная функція у мишей інбредних ліній BALA/cLac, DD/He і їх F<sub>1</sub> реципрокних кроссів / М.А. Клещев, А.В. Осадчук, Л.В.Осадчук // Вавиловський журнал генетики і селекції. — 2013. — Т. 17. № 1. — С. 123–128.
94. Клітинні культури і можливості їх використання в ембріональній біотехнології: навчально-методичний посібник (рекомендовано Міністерством освіти і науки, спорту та молоді Лист МОНмолодьспорту № 1/11 від 13.01.2012 року) / А. В. Мадіч, В. І. Шеремета, І. І. Гевкан, С. В. Федорова, О. В. Штапенко, Ю. І. Сливчук; К.: АртЕконом, 2012. — 144 с.: іл.
95. Ковтун С. І. Стан та перспективи застосування комплексних біотехнологій у скотарстві / С. І. Ковтун, О. В. Щербак, В. Ф.

Стаховський, О. В. Дуванов // Розведення і генетика тварин. — 2012. — № 46. — С. 26–29.

96. Колосова И. И. Влияние ацетата свинца, солей тяжелых металлов на репродуктивную функцию / И. И. Колосова // Вісник проблем біології і медицини. — 2013. — Т. 2, № 3. — С. 13–18.

97. Кондратовский П.М. Напушения в системе белка p53 и их влияние на патогенез хронических лимфопролиферативных заболеваний / П.М. Кондратовский, А.И. Дубиков, А. Ю. Дорошевская // Онкогематология. — 2011. — № 3. — С. 65-75.

98. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза / Б.П. Копнин // Биохимия. — 2000. — Т.65, №1. — С. 5-33.

99. Копнин Б.П. Нестабильность генома и онтогенез / Б. П. Копнин //Молекулярная биология. — 2007. — Т. 541, № 2. — С. 369-380.

100. Коренева Е. М. Металлы как факторы гипфертильности [Электронный ресурс] / Е. М. Коренева, Н. А. Карпенко, С. С. Рычкова. — Режим доступа: [woman.health-ua.com/article/330.html/](http://woman.health-ua.com/article/330.html/).

101. Корж Е. В. Перекисное окисление липидов: причина или следствие? / Е. В. Корж, В. В. Мухин, Е. Е. Латышева [и др.] // Вестник неотложной и восстановительной медицины. — 2003. — Т.4, № 2. — С. 347 – 350.

102. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, А.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–19. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев. Лаб. дело, 1991; 1: 17–19.

103. Коцюбенко Г. А. Відтворні та продуктивні якості кролів за різних технологій вирощування / Г. А. Коцюбенко // Вісник аграрної науки. — 2012. — № 2. — С. 35–37.

104. Кравців Р. Й. Біологічна роль мікроелементів в організмі тварин / Р. Й. Кравців, Р. П. Маслянюк, О. І. Жеребецька // Науковий вісник Львівської

державної академії ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького. — Львів, 2004. — Т.7, № 2.

105. Кравців Р.Й., Панчишин В.Г., Шкіль М.І. Морфофункціональна характеристика яєчників телиць при введенні мікроелементів (Zn і J) та біологічно активних речовин // Науковий вісник Національного аграрного університету. — К., 1999. — С. 205-207.

106. Крижанівська О. П. Гематологічні показники та ферментативна активність плазми крові щурів за дії гліцинату марганцю / О. П. Крижанівська, М.О. Захаренко, Л.В. Шевченко // Наукові доповіді НАУ. — 2006. — Т.2, №3. — С. 1-5. <http://www.nbu.gov.ua/e-Journals/nd/2006-2/06korgom.pdf>.

107. Кулешова Л.Г. Криомикроскопический анализ замораживания эмбрионов мыши ранних стадий развития / Л.Г. Кулешова, О.В. Пишко // Проблемы криобиологии. — 2005. — Т.15, №2. — С.119-128.

108. Курило Л.Ф. Возможности тестирования процессов митоза и мейоза женских и мужских половых клеток / Л. Ф. Курило, С. Ш. Хаят // Андрология и генитальная хирургия. — 2016. — Том 17, № 4. — С. 28-38.

109. Курило Л.Ф. Генетические и эпигенетические механизмы регуляции, хронология и динамика сперматогенеза у млекопитающих / Л.Ф. Курило, М.И. Штаут // Андрология и генитальная хирургия. — 2015. — 16(1). — 31-40. <https://doi.org/10.17650/2070-9781-2015-1-31-40>.

110. Линдін М. С. Морфогенез інфільтративного протокового раку молочної залози в умовах забруднення довкілля солями важких металів: автореф. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук за спец. 14.03.02. — патологічна анатомія / Линдін М. С., 2015, Харків, 24 с.

111. Левицький І. Морфологічні показники крові кролематок при згодуванні мікроелементних добавок / І. Левицький // Тваринництво України. — 2008. — № 11. — С. 19–21.

112. Левітін Є. Я., Ведерникова І. О., Коваль А. О., Криськів О. С. Б 63 Біоактивність неорганічних сполук: навч. посібн. для аудит. та самоств. роботи студентів / за ред. проф. Є. Я. Левітіна. — Х. : НФаУ, 2017. — 83 с.
113. Левченко В. І. Ветеринарна клінічна біохімія / [В. І. Левченко, В. В. Влізло, І. П. Кондрахін та ін.]; за ред. В. І. Левченка і В. Л. Галяса. — Біла Церква, 2002. — 400 с.
114. Лиманська А.Ю. Поєднаний дефіцит йоду і селену та його вплив на перебіг вагітності / А.Ю. Лиманська, Ю.В. Давидова, О.М. Мокрик, Л.М. Булик // Перинатология и педиатрия. — 2016. — 2(66). — С.52-56. <http://medexpert.com.ua>
115. Лисичкин Г.В. Химия привитых поверхностных соединений / [Г.В. Лисичкин, А.Ю. Фадеев, А.А. Сердан и др.]; под ред. Г. В. Лисичкина. — Москва: Физматлит, 2003. — 592 с.
116. Литвинова О.Н. Оцінка впливу екологічних чинників на показники захворюваності / О. Н. Литвинова, М. Ю. Антомонов // Довкілля та здоров'я. — 2002. — № 3. — С. 68–69.
117. Лобачова І. В. Морфологія ооцит-кумуляусних комплексів як показник умов мейотичного дозрівання / І. В. Лобачова // Наукові доповіді НУБіП. — 2012. — 5(34).
118. Лоскутова Т. А. Характеристика обмена и перекисного окисления липидов у беременных с преэклампсией и акушерскими и перинатальными осложнениями / Т. А. Лоскутова // Український Морфологічний альманах. — 2013. — Т. 11, № 1. — С. 117–119.
119. Луцак В. І. Показники оксидативного стресу. Тіобарбітурактивні продукти і карбонільні групи білків / В. І. Луцак, Т. В. Багнюкова, О. В. Луцак // Укр. біохім. журнал. — 2004. — 26. — С. 136-141.
120. Мадіч А. В. Молекулярні аспекти критичних періодів раннього ембріонального розвитку тварин / А. В. Мадіч // Біологія тварин. - 2005. - 7, № 1/2. - С. 21-30.

121. Мадіч А. Особливості одержання культури клітин ембріонального фібробласту овець / А. Мадіч, С. Федорова, І. Гевкан, Р. Кхан, О. Штапенко, Ю. Сливчук // Вісник Львівського університету ім. Івана Франка. Серія біологічна. — 2007. — Вип. 45. — С. 175-180.
122. Мадіч А.В. Використання фідерних клітин для довгострокового збереження ембріонів без зниження їх життєздатності/ А. В. Мадіч, С. В. Федорова // Біологія тварин. — 2007. — Том. 96 № 1-2. — С. 67-72.
123. Мазепа А. І. Роль міді та цинку в розвитку патології сполучної тканини / А. І. Мазепа, І. В. Мазепа // Медична хімія. — 2002. — Т. 4, № 2. — С. 71-76.
124. Максименко О. Г. Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы / О. Г. Максименко, А. В. Дейкин, Ю. М. Ходарович, П. Г. Георгиев // Acta Naturae. — 2013. — Т. 5 № 1(16). — С. 33-47.
125. Малишкіна С.В. Медико-біологічні дослідження штучних біоматеріалів для ортопедії та травматології / С.В. Малишкіна, Н.В. Дедух // Ортопедия, травматология и протезирование. — 2010. — № 2. — С. 93-100.
126. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. К.: Мир, 1984. 479 с.
127. Марушко Ю. В. Значення порушень вмісту марганцю у клінічній практиці / Ю. В. Марушко, О. В. Галиневська // Дитячий лікар. — 2013. — 4 (25). — С. 35-39.
128. Марцонь Л. В. Роль міді в процесі ембріонального розвитку [Електронний ресурс] / Л. В. Марцонь, Н. О. Корнута : Інститут екологієни і токсикології ім. Л. І. Медведя – Режим доступу: [http://www.medved.kiev.ua/arhiv\\_mg/st\\_2005/05\\_2\\_6.htm](http://www.medved.kiev.ua/arhiv_mg/st_2005/05_2_6.htm).
129. Марченко М. Л. Порівняльна характеристика цитотоксичного впливу сполук важких металів на клітини людини, культивовані in vitro / М. Л. Марченко, Н. О. Безденєжних, Ю. Й. Кудрявець // Український журнал з проблем медицини праці. — 2008. — 3(15). — С. 27-34.

130. Марченко М. Л. Вивчення цитотоксичної дії наночастинок металів на культурі клітин людини в експериментах *in vitro* / М. Л. Марченко, Н. О. Безденежних, М. Фахмі // Український журнал з проблем медицини праці. — 2011. — № 1 (25). — С. 63–70.
131. Матвієнко Н.М. Дослідження антивірусної активності препаратів у відношенні до ОНК вмісних вірусів риб // Вісник проблем біології і медицини. — 2014. — Вип. 1 (106). — С. 61-65.
132. Матвієнко Н.М. Особливості процесів переоксидного окислення ліпідів у сироватці крові цьоголіток райдужної форелі (*oncorhynchus mykiss*) в динаміці вірусної інфекції / Н.М. Матвієнко, Л.П. Драган // Вісник проблем біології і медицини. — 2013. — Вип.3, том 1(101). — С. 85-91.
133. Мацевич Л.Л., Лукаш Л.Л. Генетична активність важких металів в еукаріотичних клітинах/ Л.Л. Мацевич, Л.Л. Лукаш // Біополімери і клітина. — 2001. — Т.17 (1). — С. 5-10.
134. Медична ензимологія : навч.-метод. посіб. для студентів 2 курсу мед. та 3 курсу фармац. ф-тів) / уклад. : К. В. Александрова, В. М. Швець, О. Б. Макоїд, М. В. Дячков. — Запоріжжя : ЗДМУ, 2016. — 101 с.
135. Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования: МУ № 1741-77 [Утв. МЗ СССР 10.07.77]. М., 1977. — 20 с. 5.
136. Милостива Д. Ф. Вплив згодовування мікроелементу марганцю на показники крові телят за умов дефіциту в раціоні / Д.Ф. Милостива, В.Г. Грибан // Наук-техн бюл. — Львів, 2010 — Вип.2, № 1. — С. 88–92.
137. Милостива Д. Ф. Вплив мікроелементів на білково-азотистий обмін у молодняку української м'ясної породи / Д. Ф. Милостива // Науковотехнічний бюлетень. — Львів, 2014. — Вип. 15, № 2, 3. — С. 36–41.
138. Милостива Д.Ф. Фізіологічний стан організму і продуктивність молодняку української м'ясної породи за комплексного впливу солей  $\text{Cu}$ ,  $\text{Co}$



та Мп / Д.Ф. Милостива, 2016 дис. На здобуття наук. Ступ к.с.-г.н. 03.00.13 – фізіологія людини і тварини, Дніпропетровськ. 170 с.

139. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В. М. Моин // Лаб. дело. — 1986. — № 12. — С. 724–727.

140. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. — К: Авіценна, 2002. — 156 с.

141. Никитин А.И. Вредные факторы среды и репродуктивная система человека (ответственность перед будущими поколениями) / А.И. Никитин. — Санкт-Петербург: ЭЛБИ-СПб, 2005. — 216 с.

142. Никитин В.А. Методы введения веществ и органел в клетку в технологиях клеточной инженерии // Цитология. — 2007. — Т. 49, № 8. — С. 631-641.

143. Новое в клонировании ДНК. Методы / под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1989. 368 с.

144. Овчарук В. В. Динаміка показників антиоксидантної системи та перекисного окислення ліпідів у вагітних з дисфункцією плаценти під впливом комплексної терапії / В. В. Овчарук, А. В. Бойчук, О. І. Хлібовська // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. — 2017. — Том.1, № 3. — С. 112-116. DOI 10.11603/1811-2471.2017.v1.i3.8173.

145. Огар М. Біологічно-активні прищеплені полімерні наношари полі(N-метакрилоїл-L-амінокислот) на поверхні скла /М. Огар, Ю. Стецишин, Н. Марінцова, В. Новіков, С. Федорова, О. Штапенко // IX International Scientific Conference daRostim (7-10 October 2013). — 2013. — Р. 99-100.

146. Огар М. Формування біосумісних термочутливих полімерних покриттів на основі полі(N-метакрилоїл-L-фенілаланіну) / М. Огар, Ю. Стецишин, А. Коструба, Н. Марінцова, С. Федорова, О. Штапенко, В. Новіков // Національна науково-технічна інтернет-конференція з міжнародною участю «Актуальні проблеми синтезу і створення нових

біологічно-активних сполук та фармацевтичних препаратів» (23-25 квітня 2013 р. Львів). –С.58.

147. Огар М. О. Синтез полімерних біологічно сумісних наночарів на поверхніамінованого скла: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня к. хім. наук.: спец. 02.00.06 « хімія високомолекулярних сполук». / Огар М.О., Львів, 2014. — 21 с.

148. Огар М. Формування та властивості декстрановмісного покриття для контрольованої адсорбції альбуміну та вирощування клітин / М. Огар, Ю. Стецишин, А. Коструба, Н. Марінцова, Л. Журахівська, С. Федорова, О. Штапенко, В. Новіков // ДАН України. — 2013. — №5. — С. 511-517.

149. Огородник Н. З. Рівень вільно радикального окислення й антиоксидантного захисту та їхня корекція в поросят під час відлучення / Н. З. Огородник, О. І. Віщур, В. Л. Коваленко, А. В. Розумнюк // Ветеринарна біотехнологія. — 2015. — 26. — С. 136-142.

150. Онул Н.М. Вплив важких металів на морфологічні особливості яєчників щурів / Н.М. Онул // Вісник ВДНЗУ Українська медична стоматологічна академія Актуальні проблеми сучасної медицини. — 2013. — Т. 13, Вип. 4 (44). — С. 154-158.

151. Онул Н.М. Гігієнічна діагностика стану репродуктивного здоров'я населення промислового регіону (фактори ризику, профілактика): дис. на здобуття наук. ступеня докт. мед. наук за спец. 14.02.01. — гігієна та професійна патологія / Онул Н. М., 2015, Дніпропетровськ, 374 с.

152. Онул Н.М. Проблема чоловічого та жіночого безпліддя в умовах техногенного забруднення довкілля / Н.М.Онул // Вісник проблем біології і медицини. — 2014. — Вип. 3, Т. 3 (112). — С. 51-54.

153. Основные показатели физиологической нормы у человека: Руководство для токсикологов / Трахтенберг И.М., Тычинин В.А., Сова Р.Е. [и др.] — К.: Авиценна, 2001. — 372с.

154. Остаповець Л. І. Вплив умов культивування ооцит-кумулюсних комплексів свиней *in vitro* на розвиток партеногенетичних ембріонів / Л.І. Остаповець // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія». — 2007. — Вип. 6, №788. — С. 54-58.
155. Отримання функціоналізованих наноповерхонь для культивування клітин, ооцит-кумулюсних комплексів та ембріонів тварин: метод. реком.; затв. вченою радою Інститут біології тварин (протокол №5 від 16.09.2015 р.) / О. В. Штапенко, І. І. Гевкан, Ю. Б. Стецишин, С. В. Федорова, Ю. І. Сливчук, В. Я. Сирватка; «ДНДКІ ВП КД». Львів, 2015. 28 с.
156. Павлов В. Н. Молекулярные и метаболические аспекты мужского бесплодия / В. Н. Павлов, Э. Ф. Галимова, Б. Ф. Терегулов, В. Т. Кайбышев, Ш. Н. Галимов // Весник урологи. — 2016. — №2. — С.40-59.
157. Парфенов В.Н. Преобразования ядерных структур в оогенезе некоторых позвоночных (к вопросу о морфогенезе капсулы кариосферы). Дис. д-ра биол. наук. СПб., 1995. 48 с.
158. Пастухова В.А. Пошкодження сперматогенного епітелію яєчок, зумовленого дією хронічної гіпертермії, Морфологія. — 2009. — Т. III, №4. — С. 51-54.
159. Паткин Е. Л. Регуляторные механизмы импринтинга у млекопитающих / Е. Л. Паткин, И. О. Сучкова // Цитология. — 2006. — Т.48. — С.578–594
160. Паткин Е.Л. Влияние экотоксикантов на эмбриогенез млекопитающих: эпигенетические механизмы / Е.Л. Паткин, Л.И. Павлинова, Г.А. Софронов // Международный научный и прикладной журнал «Биосфера». — 2013. — Т.5, №4. — С.450-472.
161. Педан Л.Р. Профілактика впливу чинників навколишнього середовища на здоров'я за допомогою мікроелементу марганцю (огляд літератури) / Л.Р. Педан // Гігієна населених місць. — 2013. — №62. — С. 326-344.
162. Пертушко М. П. Амінокислотний профіль середовищ співкультивування доїмплантаційних ембріонів людини *in vitro* на моношарі

- свіжовиділених або кріоконсервованих клітин кумулюса та гранульози / М. П. Петрушко, В. І. Піняєв // Проблеми кріобіології і кріомедицини. — 2016. — Т. 26, №2. — С. 124–132.
163. Петрушко М. П. Морфофункціональні характеристики свіжовиділених та кріоконсервованих клітин гранульози та кумулюса яєчників людини / М. П. Петрушко, В. І. Піняєв, О. Б. Ревенко та ін. // Проблемы криобиологии и криомедицины. — 2014. — Т. 25, №1. — С. 57–66.
164. Пішко О.В. Влияние концентрации этиленгликоля на проницаемость мембран одно- и двухклеточных эмбрионов мыши // Проблемы криобиологии. — 2004. — №2. — С.56-61.
165. Пішко О.В. Осмотична поведінка ооцитів та ембріонів миші в гіпертонічних розчинах етиленгліколю / О.В. Пішко, Є.І. Смольянінова, Л.Ф. Розанов // Біологія тварин. — 2004. — Т. 6, № 1,2. — С. 373–377.
166. Погорелов М.В. Макро- та мікроелементи. Обмін, патологія та методи визначення): монографія / М.В. Погорелов, В.І. Бумейстер, Г.Ф. Ткач, С.Д. Бончев, В.З. Сікора, Л.Ф. Суходуб, С.М. Данильченко, — Суми: Вид-во СумДУ, 2010. — 147 с.
167. Подолянська В. В. Комплексна оцінка стану здоров'я дітей, що проживають на території, забрудненій фтором та солями важких металів / В. В. Подолянська // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: збірник наукових праць. — Київ-Луганськ-Харків. — 2000. — № 4 (30). — С. 134–144.
168. Потеемина Т. Е. Влияние теплового воздействия на сперматогенез в эксперименте / Т. Е. Потеемина, Т. С. Тукмакова // Современные технологии в медицине. — 2011. — № 4. — С. 99–101.
169. Препарат «Ліпорганік» для підвищення відтворювальної здатності кролематок: деклар. пат. на корис. модель 105740, Україна / Штапенко О. В., Гевкан І. І., Дзень Є. О., Федорова С. В. u201505160 заявл. 26.05.2015; опубл. 11.04.2016, бюл. № 7. 7 с.

170. Прімова Л.О. Метаболізм вітамінів і мінеральних речовин: навчальний посібник / Л.О. Прімова, І.Ю. Висоцький — Суми: Сумський державний університет. — 2014. — 256 с.
171. Путилина Ф. Е Практикум по свободнорадикальному окислению: учеб.-метод. пособ. / [Путилина Ф. Е., Галкина О. В., Ещенко Н. Д. и др.]; под. ред. Н. Д. Ещенко, М. Н. Маслова. — СПб: Изд. СПбГУ, 2006. — 106 с.
172. Пшеникова М. Г. Роль генетических особенностей организма в устойчивости к повреждающим воздействиям и в защитных эффектах адаптации / М. Г. Пшеникова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2011. — № 4. — С. 7–16.
173. Рамазанов В.В. Проявление и устранение эффекта “упаковки” в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами / В.В. Рамазанов, В.А. Бондаренко / Проблемы криобиологии. — 2009. — Т.19, № 3. — С. 312–325.
174. Ревич Б.А. Загрязнение окружающей среды и здоровье населения. Введение в экологическую эпидемиологию. — М.: МНЭПУ, 2001.
175. Романова Л.А. Метод определения гидроперекисей липидов с помощью тиоцианата аммония / Л.А. Романова, И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии; под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 64–66.
176. Романюк А.М. Особливості обміну мікроелементів у щитовидній залозі при проліферативних захворюваннях в умовах солей важких металів / А.М. Романюк, Р.А. Москаленко // Вісник СумДУ. Серія Медицина”. — 2007. — №1. — С. 9-14.
177. Руднева С. А. Роль микроРНК в сперматогенезе / С. А. Руднева, А. А. Хаченкова // Андрология и генитальная хирургия. — 2016. — Том17, № 1. — С.23-37.
178. Рудченко І. В. Роль макро-, мікроелементів у розвитку природжених вад / І. В. Рудченко // Досягнення біології та медицини. — 2009. — №1 (13). — С. 94-98.

179. Руководство по лабораторным методам исследований. Предтеченский В.Е., Боровская В.М., Марголина Л.Т. – М.-Л., 1993. – С. 131-165.
180. Рыжак Д.И., Артифков С.Б. Мужское бесплодие и сексуальные дисфункции. – Нижний Новгород:Издательство НГМА, 2002.
181. Санина О. Л. Биологическая роль церулоплазммина и возможности его клинического применения / О. Л. Санина // Вопросы медицинской химии. — 1986. — №5. — С. 7-14.
182. Савинцева И. В. Нанокompозитные биосинтетические раневые покрытия - субстраты для роста клеток нанокompозитные биосинтетические раневые покрытия - субстраты для роста клеток / И.В.Савинцева, И.И. Селезнева, Г.А. Давыдова, Б.К. Гаврилюк // Альманах клинической медицины. — 2008. — С.350-353.
183. Садогурська К. В. Хром і нанохром: властивості, перспективи застосування у медичній практиці / К. В. Садогурська, В. Г. Каплуненко, І. С. Чекман // Укр. мед. часопис. — 2014. — 1(99)-ІІ. — С. 14–16.
184. Салига Н. О. Вплив L-глутамінової кислоти на показники перекисного окислення ліпідів та активність окремих антиоксидантних ферментів / Н. О. Салига // Біологія тварин. — 2012. — Том 14, № 1/2. — С. 188-192.
185. Салий Н.С. Влияние пищевых рационов с различным содержанием марганца на накопление витамина А и активность церулоплазммина в организме животных / Н.С. Салий // Гигиена и санитария. — 1966. — №112. — С. 27-30.
186. Саліна А.С. Підвищення технологічності процесу кріоконсервації ооцитів миші на основі використання високих швидкостей теплообміну // Науково-технічний бюлетень ІТ УААН. — 2005. — №89. — С. 139-143.
187. Сафронова Н.А. Прогнозирование результатов программ вспомогательных репродуктивных технологий по профилю экспрессии мРНК в кумулюсных клетках: дис. на здобуття ступ. канд. мед. наук за спец. 14.01.01. – акушерство і гінекологія / Сафронова Н. А., 2017, Москва, 158 с.

188. Себа М. В. Вплив комплексів нанокарбоксилатів та препарату Кватронан-Se на гематологічні показники крові піддослідних тварин / М. В. Себа, М. О. Хоменко // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького. — 2017. — Т. 19. № 74. — С. 123–126.
189. Себа М. В. Вплив мікроелементів у формі карбоксилатів харчових кислот нанотехнологічного походження на заплідненість корів / М. В. Себа, В. Г. Каплуненко, М. О. Хоменко // Вісник Житомирського націон. агроекологічного універ. — 2015. — Т. 3. № 2 (52). — С. 225–230.
190. Селионова М. И. Использование хелатов микроэлементов с аминокислотами в молочном скотоводстве / М. И. Селионова, Е. М. Головкина // Ефективні корми та годівля: Спеціалізований журнал з питань кормів та годівлі тварин. — 2012. — № 4. — С. 35–37.
191. Сенькевич О. А. Содержание в плаценте меди, цинка, селена как предиктор неблагоприятного исхода беременности / О. А. Сенькевич, З. А. Комарова, Ю. Г. Ковальский, Н. А. Голубкина, Ю. Л. Пучкова // Дальневосточный медицинский журнал. — 2011. — № 1. — С. 47-50.
192. Сердюк А.М. Репродуктивне здоров'я чоловіків промислових територій: фактори ризику, дозонологічна діагностика, профілактика / А.М. Сердюк, Е.М. Білецька, В.П.Стусь, Н.М.Онул //Медичні перспективи. — 2016. — №1. — С. 109-116.
193. Сердюк А.М. Тяжелые металлы внешней среды и их влияние на репродуктивную функцию женщин / А.М. Сердюк, Э.Н. Белицкая, Н.М. Паранько, Г.Г. Шматков. — Днепропетровск: АРТ-ПРЕСС, 2004. — 148 с.
194. Середовище для підвищення активності проліферації клітин різних типів: деклар. пат. на корис. модель 54749, Україна / Сливчук Ю. І.,Гевкан І. І., Штапенко О. В., Федорова С. В. u201005025 Опубл. 25.11.2010, Бюл. №22.

195. Сибірна Н. О. Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу: навчально-методичний посібник / Н. О. Сибірна, О. М. Маєвська, М. Л. Барська. — Л.: ЛНУ імені І. Франка, 2006. — 60 с.
196. Сирватка В. Я. Вплив наночастинок срібла на гамети кролів *in vitro* та процес запліднення *in vivo* / В. Я. Сирватка, Ю. І. Сливчук, І. І. Розгоні, І. І. Гевкан // Біологія тварин. — 2013. — Т. 15, № 1. — С. 126-133.
197. Скальный А.В. Микроэлементозы человека (диагностика и лечение) / А.В. Скальный. 2-е изд. — М.: Изд-во КМК, — 2001. — 96 с.
198. Склярів П. М. Комплексні препарати на основі нанобіоматеріалів, перспективи використання у репродукції овець та кіз / П. М. Склярів, В. П. Кошевой // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. — 2016. — Т. 18, № 2 (66). — С. 162-165.
199. Скибчик В. А. Клінічні аспекти гіпертригліцеридемії та її корекція / В. А. Скибчик // Український медичний часопис. — 2006. — № 5. — С. 98–106.
200. Смоленко Н. П. Вплив локальної гіпертермії сім'яників на репродуктивну функцію самців щурів різного віку / Н. П. Смоленко, Е. Є. Чистякова, Є. М. Коренева, Н. О. Карпенко // Проблеми ендокринної патології. — 2014. — № 3. — С. 81-88.
201. Смольянинова Е. И. Влияние эквilibрации в среде замораживания на осмотическую устойчивость и жизнеспособность 8-клеточных эмбрионов мши / Е. И. Смольянинова, О. Б. Хроменкова, Г. В. Жерноклев, О. В. Пишко // Проблемы криобиологии. — 2004. — №1. — С.3-11.
202. Снітинський В.В. Вплив техногенного стресу на фізіологічний стан тварин і активність антиоксидантної системи / В.В. Снітинський, А.Е. Шах, Р.Я. Іскра // Фізіол. журнал. — 2002. — № 2. — С. 191.
203. Снітинський В.В. Біологічна роль хрому в організмі людини і тварин / В. В. Снітинський, Л. І. Сологуб, Г.Л. Антоняк та ін. // Укр. біохім. журн. — 1999. — 71(2). — С. 5–10.
204. Сологуб Л.І. Хром в організмі людини і тварин. / Л.І. Сологуб, Г.Л. Антоняк, Н.О. Бабич // Львів: «Євросвіт», 2007. — 127 с.



205. Спосіб активації проліферативних процесів в культурі клітин епітелію яйцепроводів: деклар. пат. на корис. модель 51687, Україна / Гевкан І. І., Нікітенко А. М., Штапенко О. В., Сливчук Ю. І., Федорова С. В. № u201001506 заявл. 15.02.2010; опубл. 26.07.2010, Бюл. №14.
206. Спосіб зниження рівня ембріональної смертності у кролематок: деклар. пат. на корис. модель 56695, Україна / Штапенко О.В., Гевкан І. І., Дзень Є. О., Федорова С. В. u20108053 заявл. 29.06.2010; опубл. 25.01.2011, бюл. №2.
207. Спосіб одержання фідерних клітин яйцепроводів: деклар. пат. на корис. модель 47452, Україна / Мадіч А.В., Гевкан І. І., Штапенко О.В., Сливчук Ю.І., Федорова С. В.; № u200904658 заявл. 12.05.2009; опубл. 10.02.2010, Бюл. №3.
208. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии; под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 63–64.
209. Стальная И.Д. Современные методы в биохимии / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили; под ред. В.Н. Ореховича. — М. Медицина, 1977. — С. 66-68.
210. Стойка Р. С. Перспективи створення наноносіїв для доставки генетичного матеріалу в клітини (за матеріалами наукової доповіді на засіданні Президії НАН України 31 січня 2018 року) / Р. С. Стойка // Вісник НААН України. — 2018. — № 3. — С. 19-32. — Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/vnanu\\_2018\\_3\\_6](http://nbuv.gov.ua/UJRN/vnanu_2018_3_6).
211. Ступарь І. І. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у свинок у різні фази статевого циклу // Вісник Полтав. держ. аграрн. академ. — 2018. — №4. — С. 178-184. DOI 10.31210/visnyk2018.04.28.
212. Стусь В. П. Вміст важких металів в нирках жителів, які мешкають в інтенсивній промисловій зоні // Урологія. — 2006. — Т. 10, № 1. — С. 45–51.

213. Стусь В. П. Вплив ксенобіотиків на фертильність чоловіків (огляд літератури) / В. П. Стусь, М. Ю. Поліон // Здоровье мужчины. — 2011. — №4.— С. 40-43.
214. Суходольська Н. В. Вміст цинку, міді, свинцю та кадмію в системі мати - плацента - плід / Н. В. Суходольська // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. — 2015. — № 2. — С. 69-77.
215. Суходольська Н. В. Методичні особливості фізіологічного моніторингу за перебігом вагітності у жінок в сучасних екологічних умовах на прикладі свинцю та кадмію: дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.03 «Нормальна фізіологія» / Суходольська Н. В. — Львів, 2016. — 170 с.
216. Татаринов Л. П. Молекулярная генетика и эпигенетика в механизмах морфогенеза / Л. П. Татаринов // Молекулярная генетика и эпигенетика в механизмах морфогенеза журнал общей биологии. — 2007. — Т. 68, №3. — С. 165-169.
217. Технічні умови ТУ 21.2-30995014-00:2018 Препарат «Ліпоорганік».
218. Трахтенберг И. М. Основные показатели физиологической нормы у человека / И.М. Трахтенберг. — Киев: Авиценна, 2001. — 372 с.
219. Трахтенберг І. М. Переваги методу дослідження токсичного впливу сполук важких металів у культурі клітин людини *in vitro* порівняно з традиційним методом *in vivo* на тваринах як більш достовірного та адекватного / І.М. Трахтенберг, М.Л. Марченко, Н.О. Безденежних, Ю.Й. Кудоявець // Сучасні проблеми токсикології. — 2010. — 2-3. — С. 69-72.
220. Трахтенберг І.М. Взаємодія мікроелементів: біологічний, медичний і соціальний аспекти / І.М. Трахтенберг, І.С. Чекман, В.О. Линник [та ін.] // Вісник національної академії наук України. — 2013. — №6. — С. 11-21.
221. Третьякова О. С. Липосомы как идеальные средства доставки лекарственных препаратов / О. С. Третьякова, И. В. Заднипрный // Здоровье ребенка. — 2009. — № 3. — С. 118–121.

222. Тронько М. Д. Біологічна роль цинку і необхідність забезпечення адекватного рівня його споживання людиною / М. Д. Тронько, М. О. Полумбрик, В. М. Ковбаса, В. І. Кравченко, Я. Г. Бальон // Вісник НАН України. — 2013. — № 6. — С.21-31. Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/vnanu\\_2013\\_6\\_5](http://nbuv.gov.ua/UJRN/vnanu_2013_6_5).
223. Турчина С. І. Цинк та соматостатевий розвиток підлітків / С. І. Турчина // Мжнар. ендокрин. журнал. — 2017. — Том 13, № 2. — С. 134–139.
224. Тяжкая О.В. Стан перекисного окислення ліпідів та антиоксидантної системи у дітей різного віку / О.В. Тяжкая, Я.М. Загородня // Перинатология и педиатрия. — 2016. — 2(66). — С. 101-105.
225. Фавье М. Микроэлементы и беременность / М. Фавье // Микроэлементы в медицине. — 2002. — Т. 3. — № 4. — С. 2-6.
226. Федорова И. Д. Генетические факторы мужского бесплодия / И. Д. Федорова, Т. В. Кузнецов // Журнал акушерства «Женские болезни». — 2007. — Том LVI, вып. 1. — С. 64-72.
227. Федорова С. Проллиферативный рост как показатель функциональности и отсутствия цитотоксичности модифицированных нанопокрывтий при культивировании клеток эмбриональных фибробластов мышей линии *NIH3/T3* / С. Федорова, О. Штапенко, І. Гевкан, Ю. Стецишин, О. Жолобко, М. Огар // Сборник материалов. Ставрополь, Россия. — 2012. — С. 199-203.
228. Федорова С.В. Вміст ТБК-активних продуктів і гідроперекисів ліпідів та активність ферментів антиоксидантного захисту в гомогенатах внутрішніх органів самиць щурів при стимуляції ембріонально-маткового сигналу за умов введення селенвмісного препарату / С.В. Федорова, І.І. Гевкан, О.В. Штапенко, Ю. І. Сливчук // Біологія тварин. — 2010— Том 12, №1. — С. 100-105.
229. Федорова С.В. Проліферативний ріст та біохімічні зміни кондиційного середовища як показники функціональності за культивування клітин яйцепроводів кролів на модифікованих покриттях / С. В. Федорова, О. В.

- Штапенко, І. І. Гевкан, І.О. Матюха., О. Жолобко, М. Огар, Ю. Б. Стецишин, Ю. І. Сливчук // Біологія тварин. —Том 14. — №1-2. — Львів, 2013. — С. 634-639.
230. Филова В. А. Вредные химические вещества. Неорганические соединения V-VIII групп / Под ред. В. А. Филова. — Л.: Химия. — 1989. — 592 с.
231. Фофанова И. Ю. Роль витаминов и микроэлементов в сохранении репродуктивного здоровья / И. Ю. Фофанова // Гинекология. — 2005. — № 4. — С. 244-249.
232. Хавтуріна Г.В. Вплив органічно-мінеральних комплексів на продуктивність і обмін речовин голштинських корів / Г.В. Хавтуріна дис. На здобування наук. Ступ. Канд. с-г. наук. 06.02.02. — годівля тварин і технологія кормів, Дніпропетровськ, 2015, 246 с.
233. Холодкова О. Л. Морфофункціональні зміни в гонадах жінок та самок тварин за фізіологічних умов та під впливом різних екзогенних чинників / О. Л. Холодкова // Медична гідрологія та реабілітація. — 2010. — Т. 8, № 4. — С. 68-71.
234. Хоменко М. О. Розробка біотехнологічного способу стимуляції заплідненості корів за використання нанокарбоксилатів мікроелементів: дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук: спец. 03.00.20 «Біотехнологія» /Хоменко М. О. — Київ, 2017. — 175 с.
235. Хомич Н.П. Стан клітинного метаболізму у тварин за дії хрому (VI) і застосування вітаміну Е та селену, дис.. к.-с-г.н., 2016 Львів антоняк
236. Цинкдефіцитні стани: сучасні погляди на проблему (Інформація АТ Кутнівського фармацевтичного заводу «Польфа» (Польща) // Укр. мед. часопис. — 1999. — №5(13). — С. 139—144.
237. Черных В.Б. Новые молекулярные технологии в диагностике генетических причин мужского бесплодия / В.Б. Черных, Т.А. Яманди, Н.Ю. Сафина // Андрология и генитальная хирургия. — 2017. — 18(1). — Р. 10-22. <https://doi.org/10.17650/2070-9781-2017-18-1-10-22>.

238. Чорнолата Л. Біогенні мікроелементи в організмі телят / Л. Чорнолата // Тваринництво України. — Київ, 2007. — № 9. — С. 39–40.
239. Чумаков П. М. Белок р53 и его универсальные функции в многоклеточном организме / П. М. Чумаков // Успехи биологической химии. — 2007. — Т. 47. — С. 3–52.
240. Шабалина Е. А. Селен и щитовидная железа / Е. А. Шабалина, Т. Б. Моргунова, С. В. Орлова, В. В. Фадеев // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. — 2010. — Том 7, №2. — С.7-18.
241. Шаран М. М. Стан і перспективи застосування біотехнологічних методів відтворення у племінному вівчарстві / М. М. Шаран, Х. М. Гримак // Наук. вісник ЛНУВМБТ ім. С.З. Гжицького. — 2017. — Том 19, №74. — С.67-70.
242. Шарафетдинов Х. Х. Оценка иммуномодулирующей активности комбинированных препаратов с содержанием цинка и эхинацеи / Х. Х. Шарафетдинов, Т. Б. Сенцова // Лечащий врач. — 2012. — № 2. — С. 104–106.
243. Шаторна В. Ф. Дослідження впливу наноматеріалів на стан репродуктивної функції в експерименті / В. Ф. Шаторна, В. І. Гарець, О. О. Савенкова, І. І. Колосова // Таврический медико-биологический весник. — 2013. — Т. 16, №1, ч. 1 (61). — С. 246-250.
244. Шафран Л. М. Металлотионены, 2011, - 428 с Shafran L. M., Pykhiteev D. M., Bol'shoy D. V. Metallotionein kak biomarker v eksperimente i klinike [Metallothionein as a biomarker in experiment and clinic]. Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii - Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry, 2011, no. 9, pp. 60-64 (in Russia).
245. Швец В. И. Липосомы в фармации. Продукты нанобиотехнологии / В. И. Швец, Ю. М. Краснопольский // Провизор. — 2008. — № 3. — С. 18–24.
246. Шевченко Л. .В. Вплив хелатних сполук мікроелементів на хімічний склад молозива свиноматок / Л. .В. Шевченко, В. М. Михальська, Л. В.

- Малюга, В. М. Поляковський, Ю. В. Гриб // Ветерин. медиц. України — 2014. — 1(25). — С. 23-25.
247. Шеремета В. І. Біохімічні показники крові самок великої рогатої худоби за використання біологічно активних препаратів / В. І. Шеремета, М. С. Грунтковський, В. Г. Каплуненко // Біологія тварин. — 2015. - Т. 17, № 2. — С. 164- 171. DOI <http://dx.doi.org/10.15407/animbiol>.
248. Шерер В. В. Дисмікроелементоз при синдромі загрози переривання вагітності та його корекція : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.01.01 «Акушерство і гінекологія» / В. В. Шерер— Одеса, 2006. — 21 с.
249. Шостя А. М. Вплив інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів та антиоксидантного захисту на репродуктивну функцію самок у ссавців / А. М. Шостя, В. Ф. Коваленко, С. О. Усенко, О. І. Цебржинський // Свинарство. — 2008. — № 56. — С. 1–13.
250. Штабський Б.М. Ксенобіотики, гомеостаз і хімічна безпека людини [Текст] / Б. М. Штабський, М. Р. Гжегоцький. - Л. : Видавничий Дім "Наутілус", 1999. — 306 с. - Бібліогр.: с.
251. Штапенко О. В. Проліферативний ріст фідерних клітин яйцепроводів у культурі при дії хлоридів кадмію, міді та нікелю/ О.В. Штапенко // Аграрний вісник Причорномор'я. — 2010. — Вип.52. — С.104-108.
252. Штапенко О. Вплив модифікованих поверхонь скла на адгезію та проліферацію клітин меланоми миші лінії В16F10 / О. Штапенко, С. Федорова, І. Гевкан, Ю. Стецишин, О. Жолобко, М. Огар // Біологія тварин. — 2011. — Т. 13, №1-2. — С.484-487.
253. Штапенко О. В. Стимуляция репродуктивной функции кролематок и оценка их физиолого-биохимических показателей крови при воздействии хром-метионина / О.В. Штапенко, Е.А. Дзень, С.В. Фёдорова // XV междунар. научно-практическая конф. «Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства», (октябрь 2012, г. Горки). — С. 60-65.

254. Штапенко О.В. Вплив хром метіоніна на проліферативний ріст культури клітин ембріонального фібробласту / О.В. Штапенко // Аграрний вісник Причорномор'я / Збірник наукових праць. — 2012 — Вип. 62. — С. 158-162.
255. Штапенко О. В. Аналіз рівня експресії генів у сім'яниках мишей за дії теплового шоку // Тези доповідей VI Міжнар. конф. молодих вчених “Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.” (13-17 травня, 2013 р., м. Одеса). — Збірник наук. матеріалів Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова — 2013. — С. 301.
256. Штапенко О. Вплив гіпертермії на експресію генів у тканинах мишей // Вісник Львівського університету ім. Івана Франка. Серія біологічна. — 2013. — Вип. 62. — С. 126-132.
257. Штапенко О. В. Порівняння проліферативної здатності клітин ендометрію при культивуванні на біогелі та модифікованому альбуміном покритті / О.В. Штапенко, С.В. Федорова, Ю.Б. Стецишин // Міжнар. науково-практична конференція “Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини” (2-3 жовтня 2014, м. Львів). — 2014. — С. 217.
258. Штапенко О. В. Клонування гену *mdm 1* мишей та його експресія у трансформованих клітинах // Український біохімічний конгрес (6-10 жовтня 2014, м. Київ). — 2014. — Т. 86, № 5 (1). — с. 229.
259. Штапенко О. В. Вплив об'ємної клітинної системи на дозрівання ранніх ембріонів мишей *in vitro* / О. В. Штапенко, Н.М. Матвієнко // «Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)». — 2017. — Том 9, Вип. 1. — С. 51-56.
260. Штапенко О. В. Обмін речовин за стимуляції відтворювальної здатності кролиць препаратом органічних мікроелементів у формі ліпосомальної емульсії / О. В. Штапенко, І.І. Гевкан, Ю. І. Сливчук, В.Я. Сирватка // «Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)». — 2017. — Том 9, Вип. 2. — С. 171-175.

261. Штапенко О. В. Ефективність ДНК інтеграції і виживаність зигот мишей за умов пронуклеарної мікроін'єкції / О. В. Штапенко, А.В. Мадіч, С. В. Федорова // Вісник Львівського університету ім. Івана Франка. Серія біологічна. — 2017. — Вип. 76. — С. 45-53.
262. Штапенко О. В. Вплив просторово-організованої культуральної системи клітин гранульози на дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів / О. В. Штапенко, І. І. Гевкан, В. Я. Сирватка, Ю. І. Сливчук // Тези V Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2017). — 2017.
263. Штапенко О. В. Особливості цитотоксичного впливу кадмій хлориду на клітини *in vitro* // О. В. Штапенко, І. І. Гевкан, Ю. І. Сливчук // Біологія тварин. — 2018. — Том 20, №1. — С. 123-130.
264. Штапенко О. В. Вплив хлориду нікелю на морфофункціональні та метаболічні характеристики клітин *in vitro* / О. В. Штапенко, Ю. І. Сливчук, І. І. Гевкана // «Наукові записки Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. — 2018. — № 2(73). — С. 68-73.
265. Штапенко О. В. Вплив органічної сполуки манган глютамату на імплантаційну здатність самок щурів / О. В. Штапенко, І. І. Гевкан, Ю. І. Сливчук, В. Я. Сирватка, Н. М. Матвієнко // Вісник проблем біології та медицини. — 2018. — Том 9, Вип. 2. — С. 171-175.
266. Шульга С. М. Ліпосоми і наносоми: Структура, властивості, виробництво / С. М. Шульга // Biotechnologia Acta. — 2013. — Vol. 6, № 5. — Р. 19–40.
267. Щербак С. О. Використання комплексних лікарських засобів з вмістом мікроелементів у лікуванні хворих на цукровий діабет / С. О. Щербак, Д. В. Кирієнко, В. Ю. Бутилін та ін. // Фармац. журн. — 2004. — 1. — С. 101–104.
268. Элленбоген А. Дозревание ооцитов *in vitro*. Показания, техника и результаты / А. Элленбоген, Е. Шалом-Пац, М. Б. Аншина // Проблемы репродукции. — 2015. — Т. 21, №1. — С. 32–40.



269. Яблонський В. А. Ветеринарне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології / В. А. Яблонський, С. П. Хомин, Г. М. Калиновський [та ін.]. — Вінниця: Нова книга. — 2008. — 600 с.
270. Яковлева М. Н. Генотоксические эффекты соединений никеля и возможности модификации никель\_индуцированного мутагенеза в клетках человека / М. Н. Яковлева, Е. В. Перминова // Токсикол. вестн. — 2007. — № 4. — С. 19–22. 14.
271. Adjaye J. Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells / J. Adjaye, J. Huntriss, R. Herwig [et al.] // Stem Cells. — 2005. — Vol. 23, №10. — P. 1514–1525.
272. Adjroud O. The toxic effects of nickel chloride on liver, erythropoiesis, and development in Wistar albino preimplanted rats can be reversed with selenium pretreatment / O. Adjroud // Environ.Toxicol. — 2013. —Vol. 28 — P. 290–298.
273. Agarwal A Role of oxidative stress in female reproduction / A. Agarwal, S. Gupta, R. K Sharma // Reprod Biol Endocrinol. — 2005. — Vol. 3 (28). — P. 1-21.
274. Ahola J.K. Effect of copper, zinc, and manganese supplementation and source on reproduction, mineral status, and performance in grazing beef cattle over two-year period / J.K. Ahola, D.S. Baker, P.D. Burns, R.G. Mortimer, R.M. Enns, J.C. Whittier, T.W. Geary, T.E. Engle // J. Anim. Sci. — 2004. — Vol. 82. — P. 2375-2383.
275. Akerfelt M. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan / M. Akerfelt, R.I. Morimoto, L. Sistonen // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. — 2010. — 11(8). — P. 545-555. doi: 10.1038/nrm2938.
276. Åkerfelt M. Promoter ChIP-chip analysis in mouse testis reveals Y chromosome occupancy by HSF2 / M. Åkerfelt, E. Henriksson, A. Laiho, A.

- Vihervaara, K. Rautoma, N. Rotaja, L. Sistonen // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — 105 (32). — P. 11224–11229.
277. Alberktsson T. Oral implant surfaces: part 2. Review focusing on clinical knowledge of different surfaces / T. Alberktsson, A. Wennerberg // Int. J. Prosthodont. — 2004. — V 17. — P. 544 – 564.
278. Allemand I. Testicular wild-type p53 expression in transgenic mice induces spermiogenesis alterations ranging from differentiation defects to apoptosis / I. Allemand, A. Anglo, A-Y. Jeantet, I. Cerutti, E. May // Oncogene. — 1999. — 18. — P. 6521-6530.
279. Alves L. B. Bioactive Glass Particles in Two-Dimensional and Three-Dimensional Osteogenic Cell Cultures / L. B. Alves, S. L. S de Souza, J. M. Taba, A.B.Jr. Novaes, P. T. Oliveira, D. B. Palioto // Draz. Dent. J. — 2017. — 28(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201600953>.
280. Angenard G. Cadmium increases human fetal germ cell apoptosis / G. Angenard, V. Muczynski, H. Coffigny, C. Pairault, C. Duquenne, R. Frydman, R. Habert, V. Rouiller-Fabre, G. Livera // Environ. Health Perspect. — 2010. — Vol. 118. — P. 331–337.
281. Antoni D. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough *in Vivo* / D. Antoni, H. Burckel, E. Josset, G. Noel // Int. J. Mol. Sci. — 2015. — Vol. 16(3). — P. 5517-5527. doi: 10.3390/ijms16035517
282. Appella E. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses / E. Appella, C. W. Anderson // Eur J Biochem. — 2001. — 268. — P. 2764–2772.
283. Aquino N. B. Role of Cadmium and Nickel in Estrogen Receptor Signaling and Breast Cancer: Metalloestrogens or Not? / N. B. Aquino, M. B. Seigny, J. Sabangan, M.C. Louie. // J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. — 2012. — №3. — P. 189-224.
284. Arita A. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium / A. Arita, M. Costa // Metallomics. — 2009. — 1. — P. 222–8.

285. Ashcroft M. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53 / M. Ashcroft, Y. Taya, K. H. Vousden // *Mol. Cell. Biol.* — 2000. — 20. — P. 3224–3233.
286. Auerbach A.B. Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection / A. B. Auerbach // *Acta Biochem. Polonica.* — 2004. — Vol. 51(1). — P. 9-31.
287. Ayoub N. Xist RNA is associated with the transcriptionally inactive XY body in mammalian male meiosis. / N. Ayoub, C. Richler, J. Wahrman // *Chromosoma.* — 1997. — 106. — P. 1-10.
288. Aziz R. Impact assessment of cadmium toxicity and its bioavailability in human cell lines (Caco-2 and HL-7702) / R. Aziz, M. T. Rafiq, J. Yang, D. Liu, L. Lu, Z. He, M. K. Daud, T. Li, X. Yang // *BioMed Research International.* — 2014. Article ID 839538, 8 pages.
289. Babaei H. Ultrastructural and morphometrical changes of mice ovaries following experimentally induced copper poisoning / H. Babaei, L. Roshangar, E. Sakhaee, J. Abshenas, R. Kheirendish, R. Dehghani // *Iranian Red. Cres. Med. J.* — 2012. — 14. — P. 558-568.
290. Baccarelli A. Epigenetics and environmental chemicals / A. Baccarelli, V. Bollati // *Curr. Opin. Pediatr.* — 2009. — Vol. 2. — P. 243–251.
291. Bagis H. Vitrification of pronuclear-stage mouse embryos on solid surface (SSV) versus in cryotube: Comparison of the effect of equilibration time and different sugars in the vitrification solution / H. Bagis, H. Sagirkaya, H. Odaman, A. Dinnyes // *Mol. Reprod. Dev.* — 2004. — Vol. 67 — P. 186–192.
292. Bai M-Y. Three-dimensional structure and cytokine distribution of platelet-rich fibrin / M-Y. Bai, C-W. Wang, J-Y. Wang, M-F Lin, W. P. Chan // *Clinics.* — 2017. — Vol. 72 (2). — P. 116-124. doi: 10.6061/clinics/2017(02)09.
293. Bailey M. M. Effects of pre- and postnatal exposure to chromium picolinate or picolinic acid on neurological development in CD-1 mice / M. M. Bailey, J. G. Boohaker, P. L. Jernigan, M. B. Townsend, J. Sturdivant, J. F. Rasco, J. B. Vincent, R. D. Hood // *Biol. Trace Elem. Res.* — 2008. — 124(1). — P. 70-82.

294. Bailey M.M. Exposure of pregnant mice to chromium picolinate results in skeletal defects in their offspring / M. M. Bailey, J. G. Boohaker, J. E. Behling, J. F. Rasco, P. L. Jernigan, R. D. Hood, J. B. Vincent // *Birth. Defects. Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* — 2006. — 77(3). — P. 244-9.
295. Baksh N. Cell sheet engineering for integrating functional tissue *in vivo*: Successes and challenges / N. Barksh, N.D. Gallant, R.G. Toomey // *MRS Bulletin.* — 2017. — Vol. 42 (5). — P. 350-355. <https://doi.org/10.1557/mrs.2017.91>
296. Bannister A. J. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain / A. J. Bannister, P. Zegerman, J. F. Partridge, E. A. Miska, J. O.Thomas, R. C. Allshire, T. Kouzarides // *Nature.* — 2001. — 410. — P. 120–124.
297. Barbey R. Polymer Brushes via Surface-Initiated Controlled Radical Polymerization: Synthesis, Characterization, Properties, and Applications / R.Barbey, L. Lavanant, D. Paripovic, N. Schuwer, C. Sugnaux [et al.] // *Chem. Rev.* — 2009. — Vol. 109. —P. 5437–5527.
298. Barker D. Fetal origins of adult disease: Strength of effects and biological basis / D. Barker, J. Eriksson, T. Forsen, C. Osmond // *Int. J. Epidemiol.* — 2002. — Vol. 31. — P. 1235–1239.
299. Basto R. Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies / R. Basto, K. Brunk, T. Vinadogrova, N. Peel, A. Franz, A. Khodjakov, J. W. Raff // *Cell.* — 2008. —133. — P. 1032–1042.
300. Baudat F. Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking *spo11* / F. Baudat, K. Manova, J.P. Yuen, M. Jasin, S.Keeney // *Mol. Cell.* — 2000. — 6. — P. 989–998.
301. Beckerman R. Transcriptional regulation by p53 / R. Beckerman, C. Prives // *Cold Spring harb perspect. Biol.* — 2010. — 2(8). :a000935. doi: 10.1101/cshperspect.a000935.
302. Behr B. Effects of culture conditions on IVF outcome / B. Behr , H. Wang // *Eur.J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 2004. — Vol. 115. — P. 72–76.

303. Belyaeva E. A.  $\text{Cd}^{2+}$ -promoted mitochondrial permeability transition: a comparison with other heavy metals / E.A. Belyaeva et al. // *Acta Biochimica Polonica*. – 2004. – Vol. 51, No. 2. – P. 545-551.
304. Benchaib M. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results / Benchaib M., Braun V., Ressnikof D. [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2005. – Vol. 20, N3. – P. 768-773.
305. Bentolila A. Poly(N-acryl amino acids): A New Class of Biologically Active Polyanions / A. Bentolila, I. Vlodavsky, R. Ishai-Michaeli, O. Kovalchuk, C. Haloun, A. J. Domb // *J. Med. Chem.* – 2000. – Vol. 43. – P. 2591-2600.
306. Bernhardt M. L. Zinc requirement during meiosis I–meiosis II transition in mouse oocytes is independent of the MOS-MAPK pathway / M. L. Bernhardt, A. M. Kim, T. V. O'Halloran, T. K. Woodruff // *Biol. Reprod.* – 2011. – Vol. 84 (3). – P. 526-536.
307. Beyersmann D. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms / D. Beyersmann, A. Hartwig // *Arch. Toxicol.* – 2008. – Vol. 82. – P. 493–512.
308. Binelli M. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells / M. Binelli, B. D. Murphy // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2010. – Vol. 22, № 1. – P. 1-12.
309. Bittrich E. Temperature-sensitive swelling of poly(N-isopropylacrylamide) brushes with low molecular weight and grafting density / E. Bittrich, S. Burkert, M. Müller, K.-J. Eichhorn, M. Stamm, P. Uhlman // *Langmuir*. — 2012. — 28 (7). — P. 3439-48. DOI: 10.1021/la204230a.
310. Blagg, B.S.J. Hsp90 inhibitors: Small molecules that transform the Hsp90 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation / B.S.J. Blagg, T.D. Kerr // *Med. Res. Rev.* — 2006. — 26. — P. 310–338.

311. Blasiak J. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium / J. Blasiak, J. Kowalik // *Mutat. Res.* – 2000. – Vol. 469, N 1. – P. 135–145.
312. Brinster R.L. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs / R.L.Brinster, H.Y.Chen, M.E.Trumbauer, M.K.Yagle and R.D.Palmiter // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1985. — V.82. — P.4438-4442.
313. Bryan M.A. Supplementing intensively grazed late-gestation and early-lactation dairy cattle with chromium / M. A. Bryan, M.T. Socha, D.J. Tomlinson // *J. Dairy Sci.* — 2004. — 87. — P. 4269-4277.
314. Brynda E. Albumin and heparin multilayer coatings for blood-contacting medical devices / E. Brynda, M. Houska, M. Jirouskova // *J Biomedical Material Research.* — 2000. — 51(2). — P. 249–257. Available from: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200008\)51:2<249::AID-JBM14>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200008)51:2<249::AID-JBM14>3.0.CO;2-X).
315. Bun S.D. Influence of organic zinc supplementation on the antioxidant status and immune responses of broilers challenged with *Eimeria tenella* / S. D. Bun, Y. M. Guo, F. C. Guo, F. J. Ji , H. Cao // *Poult. Sci.* — 2011. — Vol. 90(6). — P. 1220-6.
316. Burnik P. T. No Specific Gene Expression Signature in Human Granulosa and Cumulus Cells for Prediction of Oocyte Fertilisation and Embryo Implantation / P. T. Burnik, B. E. Vrtacnik, L. Lovrecic, A.N. Kopitar, A. Maver // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. e0115865. doi: 10.1371/journal.pone.0115865.
317. Cahilly-Snyder L. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line / L. Cahilly-Snyder, T. Yang-Feng, U. Francke, D.L. George // *Somat Cell Mol Genet.* — 1987. — 13. — P. 235–244.
318. Cai X. Y. Cryoloop vitrification of rabbit oocytes / X. Y. Cai, G. A. Chen, Y. Lian, X. Y. Zheng, H. M. Peng // *Human Reproduction.* – 2005. – 20 (7). – P. 1969-1974.

319. Casas-Delucchi C.S. Histone acetylation controls the inactive X chromosome replication dynamics / C. S. Casas-Delucchi, A. Brero, H. P. Rahn, I. Solovei, A. Wutz, T. Cremer, H. Leonhardt, M. C. Cardoso // Nat. Commun. — 2011. — V. 2. - P. 222.
320. Cavani A. Breaking tolerance to nickel / A.Cavani // Toxicology. — 2005. — Vol. 209, No. 2. – P. 119–121.
321. Cetin I. Role of micronutrients in the periconceptional period / I. Cetin, C. Berti, S. Calabrese // Human Reproduction Update. — 2009. — Vol. 16, № 1. – P. 80-95. DOI:<https://doi.org/10.1093/humupd/dmp025>.
322. Chang B. Age-related retinal degeneration (*arrd2*) in a novel mouse model due to a nonsense mutation in the Mdm1 gene / B. Chang, N. Mandal, V.R.M. Chavali, R. Ayyagari // Hum Mol Genet. — 2008. — 17(24). — P. 3929-41. doi: 10.1093/hmg/ddn295.
323. Chang H.-M. Oocyte–somatic cell interactions in the human ovary—novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors / H.-M. Chang, J. Qiao, P. C. K. Leung // Hum. Reprod. Update. — 2016. — Vol. 23, № 1. — P. 1-18.
324. Chaumeil J. Integrated kinetics of X chromosome inactivation in differentiating embryonic stem cells / J. Chaumeil, I. Okamoto, M. Guggiari, E. Heard // Cytogenet. Genome Res. — 2002. — V. 99. — № 1-4. Chaumeil J., Okamoto I., Guggiari M., Heard E. P. 75-84.
325. Checiu I. Investigations of teratogenic effects induced by copper upon early preimplantational mouse embryos / I. Checiu, M. Checiu, D. Checiu, I. Capalnasan, I. Tuduce // Annals of West University of Timisoara, Series of Biology. — 2003. — Vol. V-VI. – P. 87-94.
326. Checiu M. The effect of acute maternal CuCl<sub>2</sub> intoxication upon mouse fetal skeleton / M. Checiu, I. Checiu, I. Ilut, I. Tuduce, D. Hutanu // Annals of West University of Timisoara, Series of Biology. – 2004. – Vol. VII. – P. 61-66.
327. Chen C.Y. Nickel (II)-induced oxidative stress, apoptosis, G2/M arrest, and genotoxicity in normal rat kidney cells / C.Y. Chen, T.K. Lin, Y.C. Chang, Y.F.

- Wang, H.W. Shyu, K.H. Lin, M.C. Chou // J. Toxicol. Environ. Health. – 2010. – Vol. 73. – P. 529–539.
328. Chen H. Nickel ions increase histone H3 lysine 9 dimethylation and induce transgene silencing / H. Chen, Q. Ke, T. Kluz [et al.] // Mol. Cell Biol. – 2006. – 26. – P. 3728–3737.
329. Chen Q.Yi Mechanism of nickel carcinogenesis / Q.Yi Chen, J. Brocato, F. Laulicht, M. Costa // Molec. And Integrative Toxicol. — 2017. — Chapet 8. — P.181- 197. DOI 10.1007/978-3-319-55448-8\_8.
330. Chen S.U. et al. Vitriification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulls straws (OPS) and grids // Hum. Reprod. — 2001. — Vol. 16. — P. 2380–2356.
331. Chen W. Y. Chromium attenuates hepatic damage in a rat model of chronic cholestasis / W. Y. Chen, C. Chun-Jung, L. Jiunn-Wang, C. M. Frank // Life Sciences. – 2009 – Vol. 84. – P. 606 – 614.
332. Cheng H. H. Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects / H. H. Cheng, M. H. Lai, W. C. Hou, C. L. Huang // J. Agric. Food Chem. — 2004. — 52. — P. 1385–1389.
333. Chi Hee-Jun Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing / H-J. Chi, J-J. Koo // Hum. Reprod. — 2002. — Vol. 17 (8). — P.2146-2151.
334. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // Anal. Biochem. 1987. — 162. — P. 156 –159.
335. Chrenek P. Ultrastructure of vitrified rabbit transgenic embryos / P. Chrenek, A. V. Makarevich, M. Popelkova, J. Schlarmannova // Zygote. — 2014. — 22(4). — P. 558–564.
336. Ciemny M. P. Protein-peptide molecular docking with large-scale conformational changes: the p53-MDM2 interaction / M. P. Ciemny, A. Debinski,



- M. Paczkowska, A. Kolinski, M. Kurcinski, S. Kmiecik // *Sci. Rep.* — 2016. — 6. — P. 37532. doi: 10.1038/srep37532.
337. Colaco S. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility / S. Colaco // *Modi Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2018. — 16(1):14. doi: 10.1186/s12958-018-0330-5.
338. Colaco S. Paternal factors contributing to embryo quality / S. Colaco, D. Sakkas // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 2018. — V. 35(11). — P. 1953-1968. doi: 10.1007/s10815-018-1304-4.
339. Corn C. M. Predictive value of cumulus cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes. / C. M. Corn [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2005. — Vol. 84, № 3. — P. 627-633.
340. Coy P. Birth of piglets after transferring of in vitro-produced embryos prematured with R-roscovitine / P. Coy, R. Romar, S. Ruiz, S. Cánovas, J. Gadea, FVázquez, C. Matás // *Reproduction.* — 2005. — Vol. 129, N. 6. — P. 747-755.
341. Csankovszki G. Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation / G. Csankovszki, A. Nagy, R. Jaenisch // *J. Cell Biol.* — 2001. — V. 153. — № 4. — P. 773-784.
342. Costa M. Potential hazards of hexavalent chromate in our drinking water. /M. Costa // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* — 2003. — Vol. 188. — P. 1-5. 111.
343. D'Antò V. Effect of nickel chloride on cell proliferation / V. D'Antò, R. Valletta, M. Amato, H. Schweikl, M. Simeone, S. Padua, S. Rengo, G. Spagnuolo // *The Open Dentistry J.* — 2012. — No. 6. — P. 177-181.
344. Da L. Dual promoters control the cell-specific expression of the human cell death-inducing DFF45-like effector B gene / L. Da, D. Li, K. K. Yokoyama, T. Li, M. Zhao // *Biochem J.* — 2006. — 393. — P. 779-788.
345. Dario J. Stacchiola Fundamental Studies of Well-Defined Surfaces of Mixed-Metal Oxides: Special Properties of MO<sub>x</sub>/TiO<sub>2</sub>(110) {M = V, Ru, Ce, or W} / Dario J. Stacchiola, Sanjaya D. Senanayake, Ping Liu, Jose A. Rodriguez // *Chem. Rev.* — 2013. — 113, 6. — P. 4373-4390.

346. Daly M. J. Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance / M. J. Daly, E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai [et al.] (2007) // – Электронный ресурс. – Режим доступа: Plos Biol 5 (4):e92.doi:10.1371/journal.pbio.0050092.81.
347. De Lima EM. Cytotoxic effect of inositol hexaphosphate and its Ni(II) complex on human acute leukemia Jurkat T cells / E. M. De Lima, C. C. Kanunfre, L. F. De Andrade, D. Granato, N. D. Rosso // Toxicol In Vitro. — 2015. — 29. — P. 2081–2088.
348. De Moraes M. L. Maternal-fetal distribution of calcium, iron, copper, and zinc in pregnant teenagers and adults // M. L. De Moraes, R. de Faria Barbosa , R. E. Santo [et al.] // Biol. Trace Element Res. — 2011. — Vol. 139, № 2. — P. 126-136.
349. De Ruijter A.J.M. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family / A.J.M. De Ruijter, A. H Van Gennip, H. N. Caron, S. Kemp, A. B.P. Van Kuilenburg // Biochem. J. — 2003. — 370. — P. 737-749.
350. De Rycke M. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance / M. De Rycke, I. Leibaers, A. Van Steirteghem //Hum. Reprod. — 2002. — Vol. 17, N 10. — P.2487-2494.
351. De Vries S.S. Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis / S.S. De Vries, E.B.Baart, M. Dekker, A. Siezen, D.G. De Rooij, P. De Boer, H.te Riele // Genes Dev. — 1999 — 13. — P. 523–531.
352. Delcuve G.P. Epigenetic control / G. P. Delcuve, M. Rastegar, J. R. Davie // J. Cell. Physiol. — 2009. — 219. — P. 243-250.
353. Delia Hutanu The effect of copper chloride upon the follicles stage in mouse ovaries / Hutanu D. // Annals of RSCB. – 2012. – Vol. XVII, Issue 1. – P. 45-50.

354. DeMayo J. Genetically Engineered Mice by Pronuclear DNA microinjection / J.L. DeMayo, J. Wang, D Liang., R. Zhang, F.J. MeMayo // Curr. Protoc. Mouse Biol. — 2012. — Vol. 1. N 2. — P. 245–262.
355. DeMayo J. L. Genetically engineered mice by pronuclear DNA microinjection / J. L. DeMayo, J. Wang, D. Liang [et al.] // Curr. Protoc. Mouse Biol. — 2012. — Vol. 1. N 2. — P. 245–262.
356. Desai N. Cryoloop vitrification of human day 3 cleavage stage embryos: post vitrification development, pregnancy outcomes and live births / N. Desai, H. Blackmon, J. Szeptycki, J. Goldfarb // Reprod. Biomed. Online. — 2007. — 14. — P. 208–13.
357. Ding J. Effects of nickel on cyclin expression, cell cycle progression and cell proliferation in human pulmonary cells / J. Ding, G. He, W. Gong, W. Wen // Cancer Epidem. Biomarkers and Prevention. — 2009. — 18(6). — P. 1720-9. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0115
358. Dinneyes A. Solid surface vitrification (SSV): an efficient method for oocyte and embryo cryopreservation in cattle, pig and mouse / A. Dinneyes, X.Z. Yang, X.L. Li, H. Bagis, G.A. Presice, B. Gasparrini, G.Neglia, T. Nagai, I. Wilmut // Cryobiology. — 2001. — 43. — P. 332–338.
359. Dmytrukha N. N. To the problem of immunotoxicity lead and cadmium (Literature review) / N. N. Dmytrukha // Modern problems of toxicology. — 2009. — No. 1. — P. 4-9.
360. Do J.T. Enhanced Reprogramming of Xist by induced upregulation of Tsix and Dnmt3a / J.T. Do, D.W. Han, L. Gentile, I. Sobek-Klocke, M. Stehling, H.R. Schöler // Stem Cells — 2008. — V. 26(11). — P. 2821-2831.
361. Dohle G.R. Мужское бесплодие / G.R. Dohle, T. Diemer, A. Giwerzman, A. Jungwirth, C. Kopa, C. Krausz // European Association of Urology. — 2010. — 68 p. <http://www.uroweb.org/professional-resources/guidelines/>.
362. Dolinoy D.C. Environmental epigenomics in human health and disease / D.C. Dolinoy, R.L. Jirtle // Environ. Mol. Mutag. — 2008. — Vol. 49. — P. 4–8.

363. Dominguez F. Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system / Dominguez F. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2010. — Vol. 93, № 3. — P. 774–782.;
364. Doyle A.D. Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions / A. D. Doyle, N. Carvajal, A. Jin, K. Matsumoto, K. M. Yamada // *J. Nature Commun.* — 2015. — 6. — P. 8720.
365. Dubick M.A. Ceruloplasmin and hypoferremia: studies in burn and non-burn trauma patients / M. A. Dubick, J. L. Barr, C. L. Keen, J.L. Atkins // *Antioxidants.* — 2015. — Vol. 4, № 1.
366. Dubinina O. Y. Okusnuvaljnuj stress I kusnuvaljna modufikacija bilkiv [Oxidative stress and oxidative modification of proteins]. *Med. Himija. — Med. Chemistry*, 2001, vol. 3, № 2, pp. 5–12 (in Ukrainian).
367. Duval K. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture / K. Duval, H. Grover, L-H. Han, Y. Mou, A.F. Pegoraro, J. Fredberg, Z Chen // *Physiology.* — 2017. — Vol. 32 (4). — P. 260-277. doi: 10.1152/physiol.00036.2016
368. Edmondson R. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors/ R. Edmondson, J.J .Broglie, A.F. Adcock, L.Yang // *Assay Drg. Dev. Technol.* – 2014. – Vol. 12 (4). – P. 207–281. doi: 10.1089/adt.2014.573
369. Elbetieha A. Long-term exposure of male and female mice to trivalent and hexavalent chromium compounds: effect on fertility / A. Elbetieha, M.H. Al-Hamood // *Toxicology.* – 1997. – Vol. 116, N 1–3. – P. 39–47.
370. Ellen T.P. Heterochromatinization as a potential mechanism of nickel-induced carcinogenesis / T.P. Ellen, T. Kluz, M.E Harder, J. Xiong, M. Costa // *Biochemistry.* – 2009. – Vol. 48. – P. 4626–4632.

371. Elnatan D. Modulation of mitochondrial Hsp90 (TRAP1) ATPase activity by calcium and magnesium / D. Elnatan, D. A. Agard // CC-BY-NC-ND 4.0 International license. bioRxiv 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/300038>
372. Emiliani S. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol, and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos, and blastocysts / S. Emiliani, M. Van den Bergh, A-S. Vannin, J. Biramane, Y. Englet // Hum. Reprod. — 2000. — Vol. 15. — P. 905-910. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.4.905>
373. Erdtmann, L. The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis / L. Erdtmann, N. Franck, H. Lerat, J. Seyec, D. Gilot, I. Cannie, P. Gripon, U Hibner., C. Guguen-Guillouzo // J. Biol. Chem. — 2003. — 278(20). — P. 18256-18264.
374. Etienne O. Multilayer Polyelectrolyte Films Functionalized by Insertion of Defensin: a New Approach to Protection of Implants from Bacterial Colonization / O. Etienne, C. Picart, C. Taddei, Y. Haikel, J. L. Dimarc [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 2004. — Vol.48. — P.3662–3669.
375. Fall C. H. Micronutrients and fetal growth / C. H. Fall, C. S. Yajnik, S. Rao [et al.] // J. of Nutrit. — 2003. — Vol. 133, № 5. — P. 1747-1756.
376. Fang S. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53 / S. Fang, J. P. Jensen, R. L. Ludwig, K. H. Vousden, A. M. Weissman // J. Biol. Chem. — 2000. — 275. — P. 8945—8951.
377. Faramarzi A. Oocyte morphology and embryo morphokinetics in an intra-cytoplasmic sperm injection programme. Is there a relationship? / A. Faramarzi, M.A. Khalili, S. Ashourzadeh // Zygote. —2017. — Vol. 25 (2). — P. 190–196.
378. Farhi J. Coarse granulation in the perivitelline space and IVF-ICSI outcome / J. Farhi [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. — 2002. — Vol. 19, № 12. — P. 545-549.
379. Ferre P. The biology of peroxisome proliferator\_activated receptors. Relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity / P. Ferre // Diabetes.— 2004.— Vol. 53, suppl. N 1.— P. S43—S50.

380. Forgacs Z. Reproductive toxicology of nickel / Z. Forgacs, P. Massányi, N. Lukac, Z. Somosy // *Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* – 2012. – Vol. 47. – P. 1249–1260.
381. Forgacs Z. Specific amino acids moderate the effects on Ni<sup>2+</sup> on the testosterone production of mouse leydig cells in vitro / Z. Forgacs // *Toxicol. Environ. Health A.* — 2001. — Vol. 62(5). — P. 349—358.
382. Frassinetti S. The role of zinc in life: a review / S. Frassinetti, G. Bronzetti, L. Caltavuturo [et al.] // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* – 2006. – Vol. 25, N 3. – P. 597-610.
383. Freshney I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* / I. Freshney. – 2005. – John Wiley & Sons, Inc.
384. Friso S. Gene-nutrient interactions and DNA methylation / S. Friso, S. W. Choi // *J. Nutr.* – 2002. – 132. – P. 2382—2387.
385. Fu X. F. DAZ Family Proteins, Key Players for Germ Cell Development. / X. F. Fu, S. F. Cheng, L. Q. Wang, S. Yin, M. De Felici, W. Shen // *J Biol Sci.* — 2015. — 11(10). — P. 1226-35.
386. Fujimoto M. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress / M. Fujimoto, A. Nakai // *FEBS J.* — 2010. — Vol. 277. — P. 4112–4125.
387. Gay M. Characterization of peptides and proteins in commercial human serum albumin solutions / M. Gay, M. Carrascal, M. Gorga, A. Parés, J. Abian // *Proteomics.* – 2010. – Vol. 10. – P. 172–181. doi: 10.1002/pmic.200900182.
388. Geoffroy-Siraudin C. Ex-vivo assessment of chronic toxicity of low levels of cadmium on testicular meiotic cells / C. Geoffroy-Siraudin, M.H. Perrard, R. Ghalamoun-Slaïmi, S. Ali, F. Chaspoul, A. Lanteaume, V. Achard, P. Gallice, P. Durand, MR. Guichaoua // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 262. – P. 238–246.].
389. Godmann M. Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis / M Godmann, V. Auger, V. Ferraroni-Aguiar, A. Di Sauro, C. Sette, R. Behr, S. Kimmins // *Biol. Reprod.* — 2007. — 77. — P. 754-764.

390. Goldberg Z. Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation / Z. Goldberg, Sionov R.V., Berger M., Zwang Y., Perets R., Van Etten R. A., Oren M., Taya Y., Haupt Y. // *EMBO J.* — 2002. — 21(14). — P. 3715-3727. doi: 10.1093/emboj/cdf384
391. Gordon J.W. Gene Transfer in Mouse Eggs. Microinjection and Organelle Transplantation Techniques / J.W. Gordon // Academic Press Inc. (London) Ltd. — 1986. — P.351-370.
392. Gordon I. Laboratory Production of Cattle Embryos / I. Gordon // CAB international. — Wallingford. — UK, 1995. — P. 132.
393. Gosden R. G. Biological bases of premature ovarian failure / R. G. Gosden, M. J. Faddy // *Reprod. Fertil. Dev.* — 1998. — Vol. 10 (1). — P. 73-78.
394. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses / A. Gougeon // *Endocr Rev.* — 1996. — 17(2). — P.121–55.
395. Greaves I. K. The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z, containing facultative heterochromatin, following meiosis / I. K. Greaves, D. Rangasamy, M. Devoy, J. A. Marshall Graves, D. J. Tremethick // *Mol. Cell. Biol.* — 2006. — 26. — P. 5394-5405.
396. Guerin-Dubiard C. Proteomic analysis of hen egg white / C. Guerin-Dubiard, M. Pasco, D. Molle, C. Desert, T. Croguennec, F. Nau // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* — 2006. — Vol. 54(11). — P. 3901-3910.
397. Gunter T.E. Speciation of manganese in cells and mitochondria: a search for the proximal cause of manganese neurotoxicity / T. E. Gunter, C. E. Gavin, M. Aschner, K. K. Gunter // *Neurotoxicology.* — 2006. — Vol. 27 (5). — P. 765–776.
398. Hainzl O. The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function / O. Hainzl, M. C. Lapina, J. Buchner, K. Richter // *J. Biol. Chem.* — 2009. — 284. — P. 22559–22567;
399. Hall A. M. Dynamic and differential regulation of proteins that coat lipid droplets in fatty liver dystrophic mice / A. M. Hall, E. M. Brunt, Z. Chen, N. Viswakarma, J. K. Reddy, N. E. Wolins, B. N. Finck // *J. Lipid Res.* — 2010. — 51(3). — P. 554-63. doi: 10.1194/jlr.M000976.

400. Hanson M. A. Developmental origins of health and disease: New insights / M.A. Hanson, P.D. Gluckman // Basic and clinical Pharmacol. Toxicol. – 2008. – Vol. 102. – P. 90–93.
401. Hardman B. Expression, localisation and hormone regulation of the human copper transporter hCTR1 in placenta and choriocarcinoma Jeg-3 cells / B Hardman, U. Manuelpillai, EM Wallace, JF Monty, DR Kramer, YM Kuo, JF Mercer, ML. Ackland // Placenta. — 2006. — 27(9-10). — P. 968-977.
402. Harley K. The association of time in the US and diet during pregnancy in low-income women of Mexican descent / K. Harley, B. Eskenazi, G. Block // Paediatr. Perinatal Epidemiol. – 2005. – Vol. 19, № 2. – P. 125-134.
403. Harris S. M. Prostaglandin E2 Receptors Are Differentially Expressed in Subpopulations of Granulosa Cells from Primate Periovarian Follicles / S. M. Harris [et al.] // Biol. Reprod. – 2011. – Vol. 85, № 5. – P. 916-923.
404. He H. Elevated expression of heat shock factor (HSF) stimulates HSF1-induced transcription during stress / H. He, F. Soncin, N. Grammatikakis, Y. Li, A. Sigano, J. Gong, S. A. Brown, R. E. Kingston, S. K. Calderwood // J Biol Chem. — 2003. — 278. — P. 35465–75.
405. Healy J Ceruloplasmin and what it might do / J. Healy, K. Tipton // J Neural Transm. — 2007. — 114(6). — P. 777-781.
406. Heard E. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome / E. Heard, C.M. Disteche // Genes. Dev. – 2006. – 20(14). – P. 1848-67.
407. Hemerly A. S. Orc1 controls centriole and centrosome copy number in human cells / A.S. Hemerly, S.G. Prasanth, K. Siddiqui, B. Stillman // Stillman. Science. – 2009. – 323. – P. 789–793.
408. Henson M.C. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction / M.C. Henson, P.J. Chedrese // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2004. – Vol. 229. – P. 383–392.
409. Hininger I. Safety of trivalent chromium complexes: no evidence for DNA damage in human HaCaT keratinocytes / I. Hininger, R. Benaraba, M. Osman, H.



- Faure, A. Marie Roussel, R.A. Anderson // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 42, N 12. – P. 1759–1765.
410. Hirabayashi M. A Comparative study on the integration of exogenous DNA into mouse, rat, rabbit and pig genomes / M. Hirabayashi, R. Takahashi, K. Ito [et al.] // *Exp. Anim.* — 2001. — Vol. 50(2). — P. 125–131.
411. Horn H. F. Coping with stress: Multiple ways to activate p53 / H.F. Horn, K.H. Vousden // *Oncogene*. — 2007. — 26. — P. 1306–1316.
412. Hoter A. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease / A. Hoter, M. E. El-Sabban, H.Y. Naim // *Int. J. Mol. Sci.* — 2018. — 19(9): 2560. doi: 10.3390/ijms19092560
413. Hou Y.P. The characteristics of placental transfer and tissue concentrations of nickel in late gestational rats and fetuses / Y.P. Hou, J.Y. Gu, Y.F. Shao, Y.F. Song, Y.H. Jing, W.S. Wu, S. Pu // *Placenta*. — 2011. — Vol. 32. — P. 277–282.
414. Huang D. Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation / D. Huang, Y. Zhang, Y. Qi, C. Chen, W. Ji // *Toxicol. Lett.* — 2008. — Vol. 179. — P. 43–47.
415. Huang Z. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome / Z. Huang, D. Wells // *Mol. Hum. Reprod.* — 2010. — Vol. 16, №10. — P. 715–725.
416. Hudson N.L. The microenvironment of the ovarian follicle in the postpartum dairy cow: effects on reagent transfer from cumulus cells to oocytes in vitro / N. L. Hudson, M. C. Berg, M. P. Green [et al.] // *Theriogenology*. — 2014. — Vol. 82, №4. — P. 563–573.
417. Huh D. From 3D cell culture to organs-on-chips / D. Huh, G. A. Hamilton, D. E. Ingber // *J. Trends in Cell Biology*. — 2011. — Vol. 21, No. 12. — P. 746–754.
418. Hunter M.G. Oocyte maturation and ovum quality in pigs / M.G. Hunter // *Reviews of reproduction*. — 2000. — Vol.5, №2. — P. 122–130.

419. Hur YS. Effect of micro-vibration culture system on embryo development / YS Hur, JH Park, EK Ryu, SJ Park, JH Lee, SH Lee, J Yoon, SH Yoon, CY Hur, WD Lee // *J Assist Reprod Genet.* — 2013. — Vol. 30. — P. 835–841.
420. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Chromium, nickel and welding. Vol. 49. Lyons, France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. – 1990. – P. 49–256.
421. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: a review of human carcinogens: arsenic, metals, fibres, and dusts. Vol. 100C. Lyon, France: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2012. – P. 147–168.
422. Inohara N. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor / N. Inohara, T. Koseki, S. Chen, X. Wu, G. Nunez // *EMBO J.* — 1998. — 17:2526–2533.
423. Inoue K. Transcription factors that interact with p53 and Mdm2 / K. Inoue, E.A. Fry, D.P. Frazier // *Int. J. Cancer.* — 2016. — 138(7). — P. 1577-85. doi: 10.1002/ijc.29663.
424. Ishizaki T, Saito N, Takai O. Correlation of cell adhesive behaviors on superhydrophobic, superhydrophilic, and micropatterned superhydrophobic/superhydrophilic surfaces to their surface chemistry / T. Ishizaki, N. Saito, O. Takai // *Langmuir.* — 2010. — 26(11). — P. 147–8154. DOI: 10.1021/la904447c.
425. Ito A. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2 / A. Ito, C. H. Lai, X. Zhao, S. Saito, M. H. Hamilton, E. Appella, T. P. Yao // *EMBO J.* — 2001. — 20. — P. 1331–1340.
426. Ittner L. M. Pronuclear injection for the production of transgenic mice / L. M. Ittner, J. Gotz // *Nature protocols.* — 2007. — N 2. — P. 1206–1215.
427. Izquierdo D. Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM–IVF oocytes / D. Izquierdo, P. Villamediana, M. Lopez-Bejar, M.T. Paramio // *Theriogenology.* — 2002. — V. 57. — P. 1431–1441.

428. J. Z. Li, Control of cholesterol biosynthesis, uptake and storage in hepatocytes by Cideb / J. Z. Li, Y. Lei, Y. Wang, Y. Zhang, J. Ye, X. Xia, X. Pan, P. Li// *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. — 2010. — Vol. 1801(5). — P. 577–586.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.01.012>.
429. Jain S. K. High glucose and ketosis (acetoacetate) increases, and chromium niacinate decreases, IL- 6, IL-8, and MCP-1 secretion and oxidative stress in U937 / S. K. Jain, J. L. Rains, J. L. Croad // *Antioxid Redox Signal*. — 2007. — 9. — P. 1581–1590.
430. Jakupoglu C. Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development / C. Jakupoglu, G.K. Przemeck, M. Schneider [et al.] // *Mol. Cell. Biol*. — 2005. — V. 25. — P. 1980–1988.
431. Jia-quan Nie Effects of dietary manganese sources and levels on growth performance, relative manganese bioavailability, antioxidant activities and tissue mineral content of juvenile cobia (*Rachycentron canadum* L) / Jia-quan Nie, Xiaohui Dong, Bei-ping Tan, Shu-yan Chi, Qi-hui Yang, Hong-yu Liu, Zhang Shuang // *Aquaculture research*. — 2014. — Vol. 10. — 1-11.
432. Johnson W. L. RNA-dependent stabilization of SUV39H1 at constitutive heterochromatin / W .L. Johnson, W. T. Yewdell, J. C. Bell, S. M. McNulty, Z. Duda, R. J. O'Neill, B. A. Sullivan, A. F. Straight // *eLife* 2017;6:e25299. DOI: 10.7554/eLife.25299.
433. Jolly C. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death / C. Jolly, R. I. Morimoto // *J. National Cancer Institute*. — 2000. — Vol. 92(19). — P. 1564–1572.
434. Justice B. A. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays / B. A. Justice, N. A. Badr, R. A. Felder // *Drug discov today*. – 2009. – Vol. 14. – P. 102-10.

435. Kaipparettu B. A. Novel egg white-based 3-D cell culture system / B.A. Kaipparettu, I. Kuitse, B. Tak-Yee Chan [et al.] // *Biotechniques*. — 2008. — Vol. 45. — P. 165–168 170-161.
436. Kartberg A.-J. Vitrification with DMSO protects embryo membrane integrity better than solutions without DMSO / A.-J. Kartberg, F. Hambiliki, T. Arvidsson, A. Stavreus-Evers, P. Svalander // *Reproductive BioMedicine*. — 2008. — Vol. 17(3). — P. 378.
437. Kasprzak K. S. Nickel carcinogenesis / K.S. Kasprzak, F.W. Jr. Sunderman, K. Salnikow // *Mutat. Res.* — 2003. — Vol. 533. — P. 67–97.
438. Kelly W. G. Meiotic silencing and the epigenetics of sex / W. G. Kelly, R. Aramayo // *Chromosome Res.* — 2007. — 15. — P. 633–651.
439. Kenzelmann Broz D. In vivo analysis of p53 tumor suppressor function using genetically engineered mouse models / D. Kenzelmann Broz, L.D. Attardi // *Carcinogenesis*. — 2010. — 31. — P. 1311–1318.
440. Keskindepe L. Use of cryopreserved pronuclear embryos for the production of transgenic mice / L. Keskindepe, Y. Agca, G. A. Pacholczyk, A. Machnicka, J. K. Critser // *Biol. Reprod.* — 2001. — 65. — P. 407-411.
441. Khalil A. M. Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis / A. M. Khalil, F. Z. Boyar, D. J. Driscoll // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2004. — 101. — P. 16583-16587.
442. Khan D. Transcriptomic analysis of cyclic AMP response in bovine cumulus cells / D. Khan, C. Guillemette, M. Sirard [et al.] // *Physiol. Genomics*. — 2015. — Vol. 47, №9. — P. 432–442.
443. Kim J. Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates / J. Kim, P. Seidler, L. S. Wan, C. Fill // *J. Coll. and Interf. Sci.* — 2009. — 329. — P. 114–119.
444. Kim C. G. Effect of the polyvinylpyrrolidone concentration of cryoprotectant on mouse embryo development and production of pups: 7.5% of PVP is beneficial for in vitro and in vivo development of frozen-thawed mouse

- embryos / C. G. Kim, H. Yong, G. Lee, J. Cho / J. of Reprod. Devel. — 2008. — 54 (4). — P. 250-253.
445. Kim J-H. 3D Silk Fibroin scaffold incorporating Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle (NPs) for Tissue Engineering / J-H. Kim, F. A. Sheikh, H.W. Ju, H.J. Park // Inter. J. Biol. Macromol. — 2014. — Vol. 68. — P. 158-168. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.045
446. Kim S. I. Effect of manganese exposure on the reproductive organs in immature female rats / S. I. Kim, Y. S. Jang, S.H. Han, M. J. Choi, E. H. Go, Y. P. Cheon, J.S. Lee, S.H. Lee // Develop. and Reprod. — 2012. — Vol. 16(4). — P. 295-300.
447. Kimura N. Expression of Hyaluronan Synthases and CD44 Messenger RNAs in Porcine Cumulus-Oocyte Complexes During In Vitro Maturation / N. Kimura // Biol. Reprod. — 2002. — Vol. 66, № 3. — P. 707-717.
448. Kippler M. Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus / M. Kippler, A. M. Hoque, R. Raqib [et al.] // Toxicol. Let. J. — 2010. — Vol. 192. — P. 162-168.
449. Kofman A. E. Transcriptional analysis of histone deacetylase family members reveal similarities between differentiating and aging spermatogonial stem cells / A. E. Kofman, J. M. Huszar, C. J. Payne // Stem Cell Rev. — 2013. — 9(1). — P. 59-64. doi:10.1007/s12015-012-9392-5.
450. Kolesarova A. Metal Induced Ovarian Signaling. / A. Kolesarova, M. Capcarova, S. Roychoudhury // First Edition, Slovak University of Agriculture in Nitra. — 2010. — P.135.
451. Korfanty J. Identification of a new mouse sperm acrosome-associated protein / J. Korfanty, A. Toma, A. Wojtas, A. Rusin, N. Vydra, , W. Widlak // Reproduction. — 2012. — 143 (6). — P. 749-57. DOI: 10.1530/REP-11-0270
452. Kresyun V. I. Pharmacological characterization of compounds of germanium / V. I. Kresyun, K. F. Shemonayeva, A. G. Vidavska // Clinical Pharmacy. — 2004. — № 4. — P. 65-68. (in ukr.).

453. Krishna A. K. Risk assessment of heavy metals and their source distribution in waters of a contaminated industrial site / A. K. Krishna, K. R. Mohan // *Environmen. Sci. Pollut. Res. Int.* — 2013. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24277434>.
454. Kubbutat M. H. Regulation of p53 stability by Mdm2 / M. H. Kubbutat, S. N. Jones, K. H. Vousden // *Nature*. — 1997. — 387 . — P. 299—303.
455. Kuleshova L. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation / L. Kuleshova, J. Shaw, A. Trounson // *Cryobiology*. — 2001. — Vol. 43. — P. 21-31.
456. Kumar S. Importance of micro minerals in reproductive performance of livestock / S. Kumar, A. K. Pandey, A. W. AbdulRazzaque, D. K. Dwivedi // *Veterinary Word*. — 2011. — Vol. 4(5). — P. 230-233.
457. Kus-Liskiewicz M. Hsf1, the main regulator of the heat shock response, can act as transcriptional repressor / M. Kus-Liskiewicz, J. Polańska, M. Olbryt, J. Korfanty, A. Wojtas, O. Shtapenko, N. Vydra, A. Toma, W. Widlak // XIVth Gliwice Scientific Meetings (November 26-27, 2010, Gliwice, Poland). — 2010. — P. 71.
458. Kus-Liśkiewicz M. Impact of heat shock transcription factor 1 on global gene expression profiles in cells which induce either cytoprotective or proapoptotic response following hyperthermia / M. Kus-Liśkiewicz, J. Polańska, J. Korfanty, M. Olbryt, N. Vydra, A. Toma , W. Widlak // *BMC Genomics*. — 2013. — 14. — P. 456. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-456>.
459. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method / M. Kuwayama // *Theriogenology*. — 2007. — 67. — P. 73–80.
460. Lachner M. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins / M. Lachner, D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler, T. Jenuwein // *Nature*. — 2001. — 410. — P. 116–120.
461. Lakard S. Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials / S. Lakard, G. Herlem, A. Propper, A. Kastner, G. Michel, N.

- Vallès-Villarreal, T. Gharbi, B. Fahys // *Bioelectrochemistry*. — 2004. — Vol. 62, No. 1. — P. 19-27.
462. Langley M. Extended embryo culture in human assisted reproduction treatment / M. Langley, D. Marek, D. Gardner // *Hum. Reprod.* — 2001. — 16. — P. 902-8.
463. Latham K. Embryonic genome activation / K. Latham, R. Schultz // *Front Biosci.* — 2001. — Vol. 1, №6. — P. 748–759.
464. LeBaron R.G. Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials / R.G. LeBaron, K.A. Athanasiou // *Tissue Eng.* — 2000. — Vol. 6. — P. 85-103.
465. Lee S.Y. Simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA / S.Y. Lee, S. A. Rasheed // *Bitechniques*. — 1990. — 9(6). — P. 676-679.
466. Lees-Murdock D. J. Methylation dynamics of repetitive DNA elements in the mouse germ cell lineage / D. J. Lees-Murdock, M. De Felici, C.P. Walsh, C.P. Walsh // *Genomics*. — 2003. — 82(2). — P. 230-7. DOI: 10.1016/S0888-7543(03)00105-8
467. Legrand C. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium / C. Legrand, J. M. Bour, C. Jacob, J. Capiaumont, A. Martial, A. Marc // *J Biotechnol.* — 1992. — 25(3). — P. 231-43. DOI: 10.1016/0168-1656(92)90158-6.
468. Leslie P.L. MDM2 oligomers: antagonizers of the guardian of the genome / P.L. Leslie, Y. Zhang // *Oncogene*. — 2016. — 35(48). — P. 6157-6165. doi: 10.1038/onc.2016.88
469. Levina A. Chemical Properties and Toxicity of Chromium(III) Nutritional Supplements / A. Levina, P. A. Lay // *Chem. Res. Toxicol.* — 2008. — 21. — P. 563–571.
470. Levine R. L. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R. L. Levine // *Methods in Enzymology*. — 1990. — Vol. 186. — P. 465–478.

471. Lewis G.F. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes / G. F. Lewis, A. Carpentier, K. Adeli, A. Giacca // *Endocrine Reviews*. — 2002. — Vol. 23, N 2. — P. 201—229.
472. Li D. CpG methylation plays a vital role in determining tissue- and cell-specific expression of the human cell-death-inducing DFF45-like effector A gene through the regulation of Sp1/Sp3 binding / D. Li, L. Da, H. Tang, T. Li, M. Zhao // *Nucleic Acids Res.* — 2008. — 36. — P. 330-341.
473. Li H. Cell death-inducing DFF45-like effector b (Cideb) is present in pancreatic beta-cells and involved in palmitate induced beta-cell apoptosis / H. Li, Y. Song, L.J. Zhang, F.F. Li, Y. Gu, J. Zhang, W.P. Dong, L. Xue, L.Y. Zhang, F. Lui, J. Wang, L.N. Jiang, J. Ye, Q. Li // *Diabetes Metab. Res. Rev.* — 2012. — 28(2). — P. 145-55.
474. Li J. Z. Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation / J. Z. Li, J. Ye, B. Xue, J. Qi, J. Zhang, Z. Zhou, Q. Li, Z. Wen, P. Li // *Diabetes*. — 2007. — Vol. 56.— P. 2523-2532.
475. Li J. Z. Control of cholesterol biosynthesis, uptake and storage in hepatocytes by Cideb / J. Z. Li, Y. Lei, Y. Wang, Y. Zhang, J. Ye, X. Xia, X. Pan, P. Li // *Biochim Biophys Acta*. — 2010. — 1801. — P. 577-586.
476. Li M. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization / M. Li, D. Chen, A. Shiloh, J. Luo, A. Y. Nikolaev, J. Qin, W. Gu // *Nature*. — 2002. — 416. — P. 648—653.
477. Li R. Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos / R. Li, K. Whitworth, L. Lai et al. // *Mol. Reprod. Dev.* — 2007. — Vol. 74, №9. — P. 1228—1235.
478. Li X. Xuanhe Li Opposing roles of cell death-inducing DFF45-like effector B and perilipin 2 in controlling hepatic VLDL lipidation / X. Li, J. Ye, L. Zhou, W. Gu, E. A. Fisher, P. Li // *J. of Lipid Research*. — 2012. — 53(9). — P. 1877-1889.



479. Li Y. Zinc-induced formation of a coactivator complex containing the zinc-sensing transcription factor MTF-1, p300/CBP, and Sp1 / Y. Li, T. Kimura, R. W. Huyck [et al.] // *Mol Cell Biol.* — 2008. — Vol. Jul. 28, №13. — P. 4275–4284.
480. Liang L. Molecular cloning and characterization of CIDE-3, a novel member of the cell-death-inducing DNA-fragmentation-factor (DFF45)-like effector family / L. Liang, M. Zhao, Z. Xu, K. K. Yokoyama, T. Li // *Biochem. J.* — 2003. — 370 (Pt 1). — P. 195–203. doi: 10.1042/BJ20020656
481. Liebermann J. Vitrification of human blastocysts: an update / J. Liebermann, F. Nawroth, V. Isachenko // *Reproductive Biomedicine Online.* — 2001. — 19 (4). — P. 105–114.
482. Lin Y.S. Increased risk of cancer mortality associated with cadmium exposures in older Americans with low zinc intake / Y.S. Lin, J. L. Caffrey, J. W. Lin [et al.] // *J. Toxicol. Environm. Health, Part A.* — 2013. — Vol. 76, № 1. — P. 1-15.
483. Lindblom P. Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum-Differential tissue expression using novel antibodies / P. Lindblom, I. Rafter, C. Copley // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2007. — V.466. — P.66–77.
484. Liu L. Molecular control of oocyte meiotic arrest and resumption / L. Liu [et al.] // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2012. — Vol. 25, № 3. — P. 463-471.
485. Loison F. Up-regulation of the clus-terin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes / F. Loison, L. Debure, P. Nizard, P le Goff, D. Michel, Y. le Dréan // *Biochem J.* — 2006. — 395. — P. 223–31.
486. Loncarek J. Centriole reduplication during prolonged interphase requires procentriole maturation governed by Plk1 / J. Loncarek, P. Hergert, A. Khodjakov // *Curr Biol.* — 2010. — 20. — P. 1277–1282.
487. Lonergan P. C. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts / P. C. Lonergan, T. Fair // *Theriogenology.* — 2008. — V. 69. — P. 17–22.
488. Lönnerdal B. Dietary factors influencing zinc absorption / B. Lönnerdal // *J. Nutr.* — 2000. — Vol. 130, №5S, Suppl. — P. 1378S–83S. doi: 10.1093/jn/130.5.1378S

489. Madich A. Comparative analysis of the injectability of *in vivo* derived Morulae reaching Blastocyst stage in KSOM or M15 / A. Madich, E. Brown, L. Pearson, H. Wardle-Jones, C. Sinclair, M. Woods, S. Newman, E. Grau, S. Jolley, N. Griggs, C. Lillistone, J. McDonald, B.Doe // 12<sup>th</sup> ICTT meeting. Edinburgh. October 4-6<sup>th</sup>, 2014. P. 74.
490. Mahmoud K.Gh.M. Improvement of vitrification of *in vitro* produced buffalo embryos with special reference to sex ratio following vitrification / K.Gh.M. Mahmoud, T.H. Scholkamy, S.F. Darwish // Iran. J. Vet. Res. — 2015. — 16(4). — P. 325-330.
491. Mailhes J. B. Sensitivity of mouse oocytes to nicotine-induced perturbations during oocyte meiotic maturation and aneuploidy *in vivo* and *in vitro* / J. B. Mailhes, D. Yung, G. Caldito, S. N. London // Molecular Human Reproduction. — 2000. — Vol. 6, No. 3. — P. 232 – 237.
492. Mamyrbaev A. A. Mutagenic and carcinogenic actions of chromium and its compounds / A. A. Mamyrbaev, T. A. Dzharckenov, Z. A. Imangazina, U.A. Satybaldieva // Environ. Health. Prev. Med. — 2015. — 20(3). — P. 159-167. doi: 10.1007/s12199-015-0458-2
493. Mannervik B. Glutathione peroxidase / B. Mannervik // Methods in enzymology. Acad. Press. — 1985. — Vol. 113. — P. 490– 495.
494. Marchenko N. Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation / N. Marchenko, S. Wolff, S. Erster, K. Becker, U. Moll // EMBO J. — 2007. — 21; 26(4). — P. 923-934.
495. Marei W. F. Critical role of hyaluronidase-2 during preimplantation embryo development. / W.F. Marei, M. Salavati, A. A. Fouladi-Nashta // Mol. Hum. Reprod. — 2013. — Vol. 19, № 9. — P. 590-599.
496. Marei W. F. Role of PTGS2-generated PGE2 during gonadotrophin-induced bovine oocyte maturation and cumulus cell expansion / W. F. Marei [et al.] // Reprod. Biomed. Online. — 2014. — Vol. 28, № 3. — P. 388-400.

497. Martin J. Chromium picolinate supplementation attenuates body weight gain and increases insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. / J. Martin, Z. Q. Wang, X. H. Zhang [et al.] // *Diabetes Care*. — 2006. — 29. — P. 1826–1832.
498. Martinez-Zamudio R. Environmental epigenetics in metal exposure / R. Martinez-Zamudio, H.C. Ha // *Epigenetics*. — 2011. — Vol. 6. — P. 820–827.
499. Maruyama M. Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants / M. Maruyama, T. Kenmochi, K. Sakamoto [et al.] // *Transplant. Proc.* — 2004. — Vol. 36, N4. — P. 1133–1134.
500. Marzec, M. GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum / M. Marzec, D. Eletto, Y. Argon // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2012. — 18 (23). — P. 774–787.
501. Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals / A. Massip // *Reprod. in Domestic Anim.* — 2001. — 36 (2). — P. 49-55.
502. Mathers J. Epigenetics – potential contribution to fetal programming / J. Mathers, J. McKay // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2009. — Vol. 646. — P. 119–123.
503. Mathew A. Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2 / A. Mathew, S. K. Mathur, C. Jolly, S. G. Fox, S. Kim, R. I. Morimoto // *Mol Cell Biol.* — 2001. — 21. — P. 7163–71.
504. Matos L. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells / L. Matos, D. Stevenson, F. Gomes [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 2009. — Vol. 15, N 7. — P. 411–419.
505. Mayer W. Demethylation of the zygotic paternal genome / W. Mayer, A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele, T. Haaf // *Nature*. — 2000. — 403. — P. 501–502.
506. Maya L. D. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of MDM2 from the cytoplasm to the nucleus / L. D. Mayo, D. B. Donner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2001. — 98. — P. 11598–11603.

507. Mcardle H. J. Copper and iron transport across the placenta: regulation and interactions / H. J. Mcardle, H. S. Andersen, H. Jones, L. Gambling // J. Neuroendocrinol. — 2008. — Vol. 20, № 4. — P. 427-431.
508. McKenzie L. J. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. / L. J. McKenzie [et al.] // Hum. Reprod. — 2004. — Vol. 19, № 12. — P. 2869-2874.
509. McKiernan S. Analysis of stimulatory and inhibitory amino acids for development of hamster one-cell embryos in vitro / S. McKiernan, M. Clayton, B. Bavister // Mol. Reprod. Dev. — 1995. — Vol. 42, №2. — P. 188-199.
510. McPherson N.O. Male obesity and subfertility, is it really about increased adiposity? / N.O. McPherson, M. Lane // Asian J. of Androl. — 2015. — 17. — P. 450-458.
511. Menchikov L. G. Biological activity of organogermanium compounds: a review / L. G. Menchikov, M. A. Ignatenko // Pharmaceutical Chemistry J. — 2012. — Vol. 46 (11). — P. 3-6. (in ukr.).
512. Mercader A. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study / A. Mercader [et al.] // Fertil. Steril. — 2003. — Vol. 80, № 5. — P. 1162-1168.
513. Metzler-Guillemain C. HP1beta and HP1gamma, but not HP1alpha, decorate the entire XY body during human male meiosis / C. Metzler-Guillemain, J. Luciani, D. Depetris, M. R. Guichaoua, M. G. Mattei // Chromosome Res. — 2003. — 11. — P. 73-81.
514. Mikolajec M. *Mdm1* gene expression in spermatocytes is regulated by the heat shock transcription factor 2 / M. Mikolajec, A. Wojtas, O. Shtapenko, J. Korfanty, M. Kus-Liskiewicz, N. Vydra, A. Toma, W. Widlak // XIVth Gliwice Scientific Meetings (November 26-27, 2010, Gliwice, Poland). — 2010. — P. 73.
515. Mikolajec M. The heat shock regulates *Mdm1* gene expression in spermatocytes / M. Mikolajec, A. Wojtas, O. Shtapenko, J. Korfanty, M. Kus-

- Liskiewicz, N. Vydra, A. Toma, W. Widlak // XLV Annual Meeting of the Polish Biochemical Society (September 20-23, 2010, Wisla, Poland). — 2010. — P. 133.
516. Miksa D. Dextran Functionalized Surfaces via Reductive Amination: Morphology, Wetting, and Adhesion / D. Miksa, E. R. Irish, D. Chen // *Biomacromolecules*. — 2006. — Vol. 7. — P. 557–564. DOI: 10.1021/bm050601.
517. Minchenko A. G. Hypoxia-inducible factor1-mediated expression of the 6-phosphofructo2-kinase/fructose2,6-bisphosphatase3 (PFKFB3) gene / A. G. Minchenko, I. Leshchinsky, I. Opentanova [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277, N8. — P. 6183–6187.
518. Mistry H.D. The importance of antioxidants in pregnancy / H.D. Mistry, P.J. Williams // *Oxidative Med. And Cellul. Longevity*. — 2011. Article ID 841749, 12 pages. doi:10.1155/2011/841749.
519. Moll U. M. The MDM2-p53 Interaction / U. M. Moll, O. Petrenko // *Moll. Cancer Res.* — 2003. — 1(14). — P. 1001-8.
520. Moor K. Cryopreservation of mammalian embryos: the state of art / K. Moor, A.Q. Bonilla // *ARBS Annual Review of Biomedical Science*. — 2006. — Vol. 8 — P.19–32.
521. Mori H. Amino-Acid-Based Block Copolymers by RAFT Polymerization Macromol / H. Mori, T. Endo // *Rapid Commun.* — 2012. — Vol. 33. — P. 1090–1107.
522. Moulis J. M. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals / J. M. Moulis // *J. M. Moulis Biometals*. — 2010. — Vol. 23, no 5. — P. 877–896.
523. Müller M. M. A two-state activation mechanism controls the histone methyltransferase Suv39h1 / M.M. Müller, B. Fierz, L. Bittova, G. Liszczak // *Nat. Chem. Biol.* — 2016. — 12(3). — P. 188-193. doi: 10.1038/nchembio.2008
524. Murakami M. Influence of the DNA amount per microinjection on the development and EGFP expression in bovine embryos / M. Murakami, S.

- Ideguchi, M. Fahrudin, T. Otoi, R. A. Godke, T. Suzuki // Arch. Tierz. Dummerstorf. — 2003. — Vol. 46 (1). — P. 25-30.
525. Mykhashula G. Maternal and umbilical cord blood levels of lead, cadmium, copper and zinc / G. Mykhashula, N. Sukhodolska // 10th Bialystok International Medical Congress for Young Scientists (Bialystok, May 14-16, 2015). — Bialystok, 2015. — P. 388.
526. Nakagawa Y. Culture time of vitrified/warmed zygotes before microinjection affects the production efficiency of CRISPR-Cas9-mediated knock-in mice / Y. Nakagawa, T. Sakuma, N. Nishimichi, Y. Yokosaki, T. Takeo, N. Nakagata, T. Yamamoto // Biology Open. — 2017. doi:10.1242/bio.025122:
527. Nakai A. Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1 / A. Nakai, M. Suzuki, M. Tanabe // EMBO J. — 2000. — 19. — P. 1545–54.
528. Nakanishi J. Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences / J. Nakanishi, T. Takarada, K. Yamaguchi, M. Maeda // Anal. Sci. — 2008. — 24. — P. 67—72.
529. Namekawa S. H. Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice / S. H. Namekawa, P. J. Park, L. F. Zhang, J. E. Shima, J. R. McCarrey, M. D. Griswold, J. T. Lee // Curr. Biol. — 2006. — 16. — P. 660-667.
530. Nishijima K. Delaying embryo development by storing at 4°C for synchronization to recipients in microinjection technique in rabbits / K. Nishijima, E. Liu, S. Yamaguchi, M. Tanaka, M. Morimoto, T. Watanabe, J. Fan, S. Kitajima // Laboratory Animals. — 2013. — 47(1). — P. 53–57. doi: 10.1258/la.2012.012097.

531. Noorisafa F. Surface modification of polyurethane via creating a biocompatible superhydrophilic nanostructured layer: role of surface chemistry and structure / F. Noorisafa, A. Razmjou, N. Emams, Z-X. Low, H. Korayem, A. A. Kajani // J Experimental Nanoscience. — 2016. — 11(14). — P. 1087-1109. DOI: [10.1080/17458080.2016.1188223](https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1188223).
532. Norris R. P. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. / R. P. Norris [et al.] // Development. — 2009. — Vol. 136, № 11. — P. 1869-1878.
533. O'Carroll D. Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression / D. O'Carroll, H. Scherthan, A. H. Peters, S. Opravil, A.R. Haynes [et. al.] // Mol. Cell Biol. — 2000. — 20 (24). — P. 9423-33.
534. Ochsner S.A. Decreased expression of tumor necrosis factor-stimulated gene 6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 and EP2 null mice / S.A. Ochsner [et al.] // Endocrinology. — 2003. — Vol. 144, № 3. — P. 1008-1019.
535. Ohar M. Formation, structure and properties grafted sensitive polymer nanolayers on the base of the amino-acid derivatives / M. Ohar, Y. Stetsyshyn, A. Kostruba, J. Raczkowska, N. Marintsova, S. Fyodorova, O. Shtapenko, V. Novikov // International conference «Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2013)» (25 August-1 September 2013, Bukovel, Ukraine). —Abstract book – Bukovel, Ukraine. — 2013. —P. 299.
536. Ohinata Y. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice / Y. Ohinata, H. Ohta, M. Shigeta, K. Yamanaka, T. Wakayama, M. Saitou // Cell. — 2009. — 137(3). — P. 571-84. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.014.
537. Ostling P. Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1 / P. Ostling, J. K. Björk, P. Roos-Mattjus, V. Mezger, L. Sistonen // J. Biol. Chem. — 2007. — 282. — P. 7077–86.

538. Oswald J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote / J. Oswald, S. Engemann, N. Lane, W. Mayer, A. Olek, R. Fundele, W. Dean, W. Reik, J. Walter // *Curr. Biol.* — 2000. — 10. — P. 475–47.
539. Ouyang W. Soluble and insoluble nickel compounds exert a differential inhibitory effect on cell growth through IKK $\alpha$ -dependent cyclin D1 downregulation / W. Ouyang, D. Zhang, J. Li, U.N. Verma, M. Costa, C. Huang // *J. Cell Physiol.* — 2009. — Vol. 21(8). — P. 205–14.
540. Patkin E. L. Epigenetic mechanisms for primary differentiation in mammalian embryos / E. L. Patkin // *Int. Rev. Cytol.* — 2002. — Vol. — P. 81–130.
541. Pechova A. Chromium as an essential nutrient: a review. / A. Pechova, L. Pavlata // *Veterinari Medicina.* — 2007. — 52(1). — P. 1–18.
542. Penny M. E. Zinc supplementation in public health / M. E. Penny // *Ann. Nutrit. Metabol.* — 2013. — Vol. 62. — P. 31–42.
543. Perfetto B. Analysis of the signal transduction pathway of nickel-induced matrix metalloproteinase-2 expression in the human keratinocytes in vitro: preliminary findings / B. Perfetto, M. Lamberti, M. T. Giuliano // *J. Cutan. Pathol.* — 2006. — Vol. 34(6). — P. 441–447.
544. Perri M. E. The Regulation of the p53-mediated Stress Response by MDM2 and MDM4 // M. E. Perri // *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* — 2010. — 2(1). — P. 1–11. doi: 10.1101/cshperspect.a000968.
545. Peters A. H. Loss of the *Suv39h* histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability / A. H. Peters, D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer [et al.] // *Cell.* — 2001. — Vol. 107. — P. 323–337.
546. Phillips K. P. Mechanisms of obesity-induced male infertility / K. P. Phillips, N. Tanphaichitr // *Expert. Rev. Endocrinol. Metab.* — 2010. — 5(2). — P. 229–251.
547. Pickard B. Epigenetic targeting in the mouse zygote marks DNA for later methylation: a mechanism for maternal effects in development / B. Pickard, W.



- Dean, S. Engemann, K. Bergmann, M. Fuermann, M. Jung, A. Reis, N. Allen, W. Reik, J. Walter // *Mechan. Dev.* — 2001. — 103(1-2). — P. 35-47.
548. Pine M. Manganese acts centrally to stimulate luteinizing hormone secretion: a potential influence on female pubertal development / M. Pine, B. Lee, R. K. Dearth, J. K. Hiney // *Toxico. Sci.* — 2005. — 85(2). — P. 880-885.
549. Plachot M. Fertilization abnoemalities in human in vitro fertilization / M. Plachot, N. Crozet // *Hum. REprod.* — 1992. — 7. — P. 89-94.
550. Pollack A. Z. Cadmium and reproductive health in women: a systematic review of the epidemiologic evidence / A.Z. Pollack, S. Ranasinghe, L.A. Sjaarda, S.L. Mumford // *Curr. Environ. Helth. Rep.* — 2014. — Vol. 1, no 2. — P. 172-184.
551. Popp C. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency / C. Popp, W. Dean, S. Feng, S.J. Cokus, S. Andrews, M. Pellegrini, S.E. Jacobsen, W. Reik // *Nature.* — 2010. — 463(7284). — P. 1101-5. doi: 10.1038/nature08829.
552. Porté-Durrieu M. C. Development of RGD peptides grafted onto silica surfaces: XPS characterization and human endothelial cell interactions / M. C. Porté-Durrieu, C. Labrugère, F. Villars, F. Lefebvre, S. Dutoya, A. Guette, L. Bordenave, C. Baquey // *J Biomed Mater Res.* — 1999. — Vol. 46. — P. 368-375.
553. Posillico S. Ovarian tissue vitrification: modalities, challenges and potentials / S. Posillico, A. Kader, T. Falcone, A. Agarwal // *Current Women's Health Reviews.* — 2010. — Vol. 6. — P. 352–366.
554. Pratt H.P.M. Isolation, culture and manipulation of preimplantation mouse embryos / In “Mammalian Development”, M. Monk ed., pp. 13-42 Oxford: IRL Press.
555. Protein-Based Films and Coatings // Edited by Aristippos Gennadios/ Cardinal Health, Inc., Somerset, New Jersey, USA / CRC Press 2002. 672 p.
556. Pulido M.D. Metal-induced apoptosis: mechanisms / M.D. Pulido, A.R. Parrish // *Mutation Res.* — 2003. — Vol. 533. — P. 227–241.

557. Raczkowska J. Temperature-responsive peptide-mimetic coating based on poly(N-methacryloyl-L-leucine): properties, protein adsorption and cell growth / M. Ohar, Yu. Stetsyshyn, Zemla J., K. Awsiuk, J. Rysz, K. Fornal, A. Bernasik, H. Ohar, S. Fedorova, O. Shtapenko, S. Polovkovych, V. Novikov, A. Budkowski // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2014. – 118. – P. 270-279.
558. Raczkowska J. Temperature-responsive peptide-mimetic coating based on poly(N-methacryloyl-L-leucine): Properties, protein adsorption and cell growth / J. Raczkowska, M. Ohar, Yu. Stetsyshyn, J. Zemła, K. Awsiuk, J. Rysz, K. Fornal, A. Bernasik, H. Ohar, S. Fedorova, O. Shtapenko, S. Polovkovych, V. Novikov, A. Budkowski // 8<sup>th</sup> ECNP International Conference on Nanostructured Polymers and Nanocomposites (September 14-16, 2013, Dresden, Germany). – P. O30.
559. Rao V.K. A drive in SUVs: From development to disease Epigenetics (in press) / V. K. Rao, A. Pal, R. Taneja // 2017. — 12(3). — P. 177-186. doi: 10.1080/15592294.2017.1281502.
560. Rea S. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases / S. Rea [et al.] // *Nature*. — 2000. — 406. — P. 593–599.
561. Reijo R. A. DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice / R.A. Reijo, D.M. Dorfman, R. Slee, A.A. Renshaw, K.R. Loughlin, H. Cooke [et al.] // *Biol. Reprod.* — 2000. — Vol. 63. — P. 1490–6. doi: 10.1095/biolreprod63.5.1490.
562. Reik W. Epigenetics reprogramming in mammalian development / W. Reik, W. Dean, J. Walter // *Science*. — 2001. — 293(5532). — P. 1089-93.
563. Reik W. Epigenetics: Cellular memory erased in human embryos / W. Reik, G. Kelsey // *Nature*. — 2014. — 511. — P. 540-541.
564. Rienzi L. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance / L. Rienzi, C. Gracia, R. Maggiulli, A. LaBarbera, D. J. Kaser, F. M. Ubaldi, S. Vanderpoel, C. Racowsky // *Human Reproduction Update*. — 2017. — Vol. 23 (2). — P. 139-155.

565. Rockett J. C. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression and fertility in adult male mice / J. C. Rockett, L.Faye, J. Map, B. Garges, J. Chistopher // *Biol. of Reprod.* — 2001. — Vol. 65. — P. 229–239.
566. Roungsipragarn R. Plasma zinc level and intrauterine growth retardation: a study in pregnant women in Ramathibodi Hospital / R. Roungsipragarn, S. Borirug, Y. Herabutya // *J. Med. Assoc. Thai.* — 1999. — Vol. 82, N 2. — P. 178–181.
567. Roychoudhury S. Copper-induced changes in reproductive functions: in vivo and in vitro effects / S. Roychoudhury, S. Nath, P. Massanyi, R. Stawarz, M. Kacaniova, A. Kolesarova // *Physiol. Res.* — 2016. — Vol. 65. — P. 11-22.
568. Russell D. L. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex / D. L. Russell, R. L. Robker // *Human Reproduction Update.* — 2007. — Vol.13, № 3. — P. 289–312.
569. Sagirkaya H. Vitrification of pronuclear-stage mouse embryos on aluminum foil floating on liquid nitrogen / H. Sagirkaya, F. Ergin, H. Bagis, S. Arat // *Reprod., Fertility and Develop.* — 2003. — 16(2). — P. 181–181.
570. Saitou M. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells / M. Saitou, S. Kagiwada, K. Kurimoto // *Development.* — 2012. — 139. — P. 15-31. doi: 10.1242/dev.050849
571. Sakamoto M. Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: potential use as indicators for prenatal exposure / M. Sakamoto, A. Yasutake, J. L. Domingo et al. // *Environ. Int. J.* — 2013. — Vol. 60. — P. 106-111.
572. Sako T. Comparison of plasma metabolite concentrations and lactate dehydrogenase activity in dogs, cats, horses, cattle and sheep / T. Sako, S. Urabe, A. Kusaba [et al.] // *Veterinary Research Commun.* — 2007. — No 31. — P. 413-417.
573. Salmand P.A. Mouse Heat-Shock Factor 1 (HSF1) is involved in testicular response to genotoxic stress induced by doxorubicin / P. A. Salmand, T. Jungas,

M. Fernandez, A. Conter, E.S. Christians // *Biol. of Reprod.* — 2008. — Vol. 79 (6). — P. 1092-1101.

574. Sandqvist A. Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli / A. Sandqvist, J.K. Bjork, M. Akerfelt, Z. Chitikova, A. Grichine, C. Vourch, C. Jolly, T.A. Salminen, Y. Nymalm, L. Sistonen // *Mol. Biol. Cell.* — 2009. — 20 (5). — P.1340–1347. doi: 10.1091/mbc.E08-08-0864.

575. Saragusty J. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification / J. Saragusty, A.Arav // *Reproduction.* — 2011. — № 141. — P. 1–19.

576. SCF (Scientific Committee on Food). Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. EFSA, February 2006. – 480 p.

577. Sarah-Jane Rymer Self-assembling peptides and their potential applications in biomedicine / Rymer Sarah-Jane, Tendler Saul J.B., Bosquillon Cynthia, Washington Clive, Roberts Clive J. // *Therapeutic Deliv.* — 2011. — 2 (8).  
**Doi:** <https://doi.org/10.4155/tde.11.74>

578. Sedo C. A. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects / C. A. Sedo, M. Bilinski, D. Lorenzi, H. Uriondo, F. Noblia, V. Longobucco, E. V. Lagar, F. Nodar // *JBRA Assist. Reprod.* — 2017. — 21(4). — P. 343-350. doi: 10.5935/1518-0557.20170061.

579. Seisenberger S. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers / S. Seisenberger, J.R. Peat, T.A. Hore, F. Santos, W. Dean, W. Reik // *Phil. Trans. R. Soc. B.* — 2013. — Vol. 368 — doi: 10.1098/rstb.2011.0330.

580. Seisenberger S. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells / S. Seisenberger, S. Andrews, F. Krueger, J. Aand, J. Walter et. al. // *Mol. Cell.* — 2012. — 48(6). — P. 849-62. doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.001.

581. Seyoum G. The embryopathic effects of zinc deficiency and the influence of zinc supplementation on growth and organogenesis in zinc deficient rat embryos / G. Seyoum // *Ethiop. Med. J.* — 2006. — Vol. 44, N 4. — P. 353–462.
582. Shafran L. M. Metallothionein kak biomarker v eksperimente i klinike [Metallothionein as a biomarker in experiment and clinic] / L. M. Shafran, D. M. Pykhiteev, D. V. M. Bol'shoy // *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry.* — 2011. — no. 9. — P. 60-64 (in Russia).
583. Shao L. Genomic expression profiles in cumulus cells derived from germinal vesicle and MII mouse oocytes / L. Shao [et al.] // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2016. — Vol. 28, № 11. — P. 1798.
584. Sheynkin Y. Increase in scrotal temperature in laptop computer users / Y. Sheynkin, M. Jung, P. Yoo, D. Schulsinger, E. Komaroff // *Hum. Reprod.* — 2005. — 20(2). — P. 452-455.
585. Shi Q. Grafting short-chain amino acids onto membrane surfaces to resist protein fouling / Q. Shi, Y. L. Su, W. J. Chen, J. M. Peng, L. Y. Nie, L. Zhang, Z. Y. Jiang // *Membr. Sci.* — 2011. — Vol. 366. — P. 398–404.
586. Shimada M. Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization / M. Shimada [et al.] // *Development.* — 2010. — Vol. 135, № 11. — P. 2001-2011.
587. Shinkawa T. Heat shock factor 2 is required for maintaining proteostasis against febrile-range thermal stress and polyglutamine aggregation / T. Shinkawa, K. Tan, M. Fujimoto, N. Hayashida, K. Yamamoto, E. Takaki, R. Takii, R. Prakasam, S. Inouye, V. Mezger [et al.] — *Mol. Biol. Cell.* — 2011. — 22. — P. 3571–83.
588. Shiota K. Assisted reproductive technologies and birth defects / K. Shiota, S. Yamad // *Congenital Anomalies.* — 2005. — Vol. 45, N 2. — P.39-43.
589. Shtapenko O. Development of non- and vitrified-thawed pronuclear-stage mouse embryos co-cultured with oviduct epithelial cells / O. Shtapenko, S.

Fyodorova, A. Madich // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. — 2013. — Вип. 2(64). — С. 15-17.

590. Shtapenko O. Survival and development of pronuclear-stage mouse embryos after droplet vitrification in different vitrification solutions / O. Shtapenko, S. Fyodorova, A. Madich // «Mammalian Embryology Conference. Celebrating Work of Professor Andrzej K. Tarkowski» (25-26 October 2013 Warsaw, Poland). — 2013. — P. 55.

591. Shtapenko O. The influence of chromium methionine supplementation on haematological and biochemical indices and reproductive function of female rabbits during early pregnancy / O. Shtapenko, I. Hevkan, Ye. Dzen`, S. Fedorova // 5th International Young Scientists Conference „Human – Nutrition – Environment” “Biotechnology for sustainable development” (24-25 April, 2014, Rzeszów, Poland). – 2014.– P. 60.

592. Shtapenko O. Effect of some microelements in liposomal forms on blood parameters in female rabbits during gestation / O. Shtapenko, I. Hevkan, Y. Dzen`, S. Fedorova, Y. Slyvchuk, V. Syrvatka, I. Matuha // International Scientific Symposium “Modern animal husbandry – strategies, opportunities and performances” (23-25 October, 2014, Iasi, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Romania). – 2014.– P. 36.

593. Shtapenko O. Influence of some organic trace elements on biochemical profile and reproductive function of female rabbits / /O. Shtapenko, I. Hevkan, Y. Dzen`, S. Fedorova, Y. Slyvchuk, V. Syrvatka, I. Matuha // KRMIVA 2014, 21th International Conference (4 - 6 June, 2014, Opatija Hrvatska, Croatia). – 2014.– P. 60.

594. Shtapenko O. Effect of liposomal prepartate with some organic trace elements on antioxidant status and reproductive ability of female rabbits / O. Shtapenko, I. Gevkan, Ye. Dzen`, S. Fedorova, Yu. Sluvchyk, V. Syrvatka, I. Matiukha // Scientific Papers. Series D. Animal Science. Vol. LVIII, 2015 ISSN 2285-5750. — P. 221-227.

595. Shtapenko O. Changes in activities of antioxidant enzyme and biochemical indices in blood during gestation in rabbits under influence of some organic microelements in liposomal form / O. Shtapenko, Y. Dzen', S. Fedorova, Y. Slyvchuk // XIIth International Conference of Young Researchers „Physiology and Biochemistry in Animal Nutrition” (23-24 September 2015, Łowicz, Poland). –2015. – P. 58.
596. Shtapenko O. Comparative toxicity screening of organic and inorganic copper salts on oviduct epithelial cell culture in vitro / O. Shtapenko, I. Hevkan, S. Fedorova, Yu. Slyvchuk, I. Matuha, V. Syrvatka // Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds. – Rzeszów, 2015. – P. 215-223.
597. Shtapenko O. V. The impact of introduction organic microelements in liposomal form on oxidative stress biomarkers and antioxidant system in tissues of female rabbits / O. V. Shtapenko, , I. O. Matiukha, I. I. Gevkan // Біологія тварин. Тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини», присвяченої 55-річчю Інституту біології тварин НААН.– 2015. – Т. 17, № 3. – С. 188.
598. Shtapenko O. Effect of the surfaces modified by different bioactive polymeric on the cell viability and proliferation / O. Shtapenko, S. Fedorova, I. Gevkan, Yev. Dzen', Yu. Stetsyshyn // 9th International Conference – “Structure and Stability of Biomacromolecules” (SSB 2015). – Kosice, Slovakia. –2015. – P. 128-129.
599. Shtapenko O. The influence of trace elements in the form of liposomal compounds on antioxidant defense system and parameters of oxidative stress in the reproductive organs of female rabbits / O. Shtapenko, I. Matiukha, I. Hevkan, H. Tkachenko // Slupskie Prace Biologiczne — 2015. — № 12. – P. 173-186.
600. Shtapenko O. The influence of organic zinc, manganese and chromium in liposomal form on antioxidant status and pregnancy outcome in rabbits // 20th

International Symposium on Housing and Diseases of Rabbits, Furproviding Animals and Pet Animals (May 17 - 18, 2017, Celle, German).

601. Shtapenko O. The influence of surfaces modified by different polymeric on the growth of mouse embryonic fibroblasts cell line NIH3T3 // Біологія тварин. — 2017. — Том 19, №2. — С. 121-126.

602. Shtapenko O. V. Effect of organic microelements liposomal form on fertilizing ability and antioxidant status of female rabbits / O. V. Shtapenko, I. I. Gevkan, Yu. I. Sluvchyk, Ye. O. Dzen`, V. Y. Syrvatka, N. M. Matvienko // Acta Biotechnology. — 2018. — T. 11, № 4. — С. 50-56.

603. Shtapenko O. V. Formation and properties polymer nanolayers to enhance cell growth *in vitro* / O. V. Shtapenko, I. I. Gevkan, Yu. I. Sluvchyk, V. Y. Syrvatka, N. M. Matvienko // Innow. Biosyst. Bioeng. — 2018. — Vol. 2, no. 2. — P. 105-109.

604. Shtapenko O. Effect of zinc glutamate on embryogenesis of female rats / Shtapenko O., Hevkan I., Dzen` Ye., Slyvchuk Y., Syrvatka V. // XXIV Symposium of immunology and reproduction with international participation (May 17-19, 2018, The Castle, Trest, Czech Rebuclia).

605. Shu-Ping Lin. On-line observation of cell growth in a three-dimensional matrix on surface-modified microelectrode arrays / Shu-Ping Lin., Themis R. Kyriakides, Jia-Jin J. // Chen Bimaterials. — 2009. — Vol. 30. — P. 3110-3117.

606. Sidera K. Extracellular HSP90: conquering the cell surface / K. Sidera, E. Patsavoudi // Cell Cycle. — 2008. — 7(11). — P. 1564-8.

607. Silbergeld E. K. Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action / E. K. Silbergeld, M. Waalkes, J. M. Rice // Am. J. Ind. Med. — 2000. — 38. — P. 316-323.

608. Simon L. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development / L. Simon, K. Murphy, M. B. Shamsi, L. Lui, B. Emery, K.I. Aston, J. Hotaling, D.T. Carrell // Hum. Reprod. — 2014. — 29(11). — P. 2402-2412. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu228>.



609. Sirisathein S. Influences of epidermal growth factor and insulin growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro / S. Sirisathein, H. J. Hernandez-Fonseca // *Animal Reproduction Science*. — 2003. — V. 77, № 1-2. — P. 21-32.
610. Smallwood J. Aromatherapy and behaviour disturbances in dementia: a randomized controlled trial / J. Smallwood, R. Brown, F. Coulter, E. Irvine, C. Copland // *Int. J. Geriatr. Psychiatry*. — 2001. — 16(10). — P. 1010-3.
611. Smith Z.D. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo / Z.D. Smith, M.M. Chan, T.S. Mikkelsen, H. Gu, A. Gnirke, A. Regev, A. Meissner // *Nature*. — 2012. — 484(7394). — P. 339-44. doi: 10.1038/nature10960
612. Snow E.T. Effects of chromium on DNA replication in vitro / E.T. Snow // *Environ. Health Perspect.* — 2004. — Vol. 102 (Suppl 3). — P. 41–44.
613. Sreedhar A. S. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance / A. S. Sreedhar, E. Kalmar, P. Csermely, Yu-Fei Shen // *FEBS letters*. — 2004. — 562. — P. 11–15.
614. Sreejayan N. Chromium alleviates glucose intolerance, insulin resistance, and hepatic ER stress in obese mice / N. Sreejayan, F. Dong, M.R. Kandadi, X. Yang, J. Ren // *Obesity (Silver Spring)*. — 2008. — Vol. 16, N 6. — P. 1331–1337.
615. Sriram G. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro / G. Sriram, P.L. Bigliardi, M. Bigliardi-Qi // *Europ. J. of Cell Biol.* — 2015. — Vol. 94, Issue 11. — P. 483–512.
616. Stearns D.M. Chromium (III) picolinate produces chromosome damage in chinese hamster ovary cells / D.M. Stearns, J.P. Wise, S.R. Patierno, K.E. Wetterhahn // *FASEB J.* — 1995 (b). — Vol. 9. — P. 1643–1648.
617. Stearns D.M. Chromium (III) tris (picolinate) is mutagenic at the hypoxanthine (guanine)phosphoribosyltransferase locus in Chinese hamster ovary cells / D.M. Stearns, S.M. Silveira, K.K. Wolf, A.M. Luke // *Mutat. Res.* — 2002. — Vol. 513. — P. 135–142.

618. Stern Bonnie R. Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: overview, update and regulatory considerations / R. Stern Bonnie // J. Toxicol. Environmen. Health. Part A. – 2010. – Vol 73. – P. 114-127.
619. Stetsyshyn Y. Investigation of the adsorption of albumin on the surface modified glass by ellipsometry / Y. Stetsyshyn, A. Kostruba, X. Hahraj // Herald of Lviv Univer. — 2010. — Vol. 54. — P. 51-58.
620. Stetsyshyn Yu. Modification of poly(ethylene terephthalate) surface by attached dextran macromolecules / Yu. Stetsyshyn, V. Donchak, Kh. Harhay, S. Voronov, J. Raczowska, A. Budkowski // Polym. Int. — 2009. — Vol 58, Issue 9. — P. 1034–1040.
621. Stetsyshyn Yu. Synthesis and Postpolymerization Modification of Thermoresponsive Coatings Based on Pentaerythritol Monomethacrylate: Surface Analysis, Wettability, and Protein Adsorption / Yu. Stetsyshyn, J. Raczowska, A. Budkowski, A. Kostruba, K. Harhay, H. Ohar, K. Awsiuk, A. Bernasik, N. Ripak, J. Zemła // Langmuir. — 2015. — 31(35). — P.9675–9683.
622. Stommel J. M. Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation / J. M. Stommel, G. M. Wahl // EMBO J. — 2004. — 23. — P. 1547–1556.
623. Straif K. A review of human carcinogens—Part C: metals, arsenic, dusts, and fibres / K. Straif, L. Benbrahim-Talloori, R. Baan, Y. Grosse, B. Secretan, F. El Ghissassi, B. Bouvard, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet, V. Coglianor // Special Report: Policy. Lancet Oncol. — 2009. — Vol. 10. — P. 453–454.
624. Sun H. Z. Relationship between CIDE-B change and neuronal apoptosis under various injuring conditions / H. Z. Sun, Z. G. Wang. P. F. Zhu // Chin. J. Trauma. — 2006. — 22. — P. 535-538.
625. Sutton-McDowall M. L. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence / M. L. Sutton-McDowall, R. B. Gilchrist, J. G. Thompson // Reproduction. — 2010. — Vol. 139, № 4. — P. 685-695.

626. Takiguchi M. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation / M. Takiguchi, W.E. Achanzar, W. Qu, G. Li, M.P. Waalkes // *Exp. Cell Res.* — 2003. — Vol. 286. — P. 355–365.
627. Talbot P. In vitro assessment of reproductive toxicity of tobacco smoke and its constituents / P. Talbot // *Birth Defects Results. Part C. Embryology Today.* — 2008. — Vol. 84 (1). — P. 61 – 72.
628. Talbot P. Smoking and reproduction: the oviduct as a target of cigarette smoke / P. Talbot, K. Riveles // *Reproductive Biology and Endocrinology.* — 2005. — Vol. 3. — P. 52 – 70.
629. Tang X. Human cell-death-inducing DFF45-like effector C induces apoptosis via caspase-8 / X. Tang, Z. Xing, H. Tang, L. Liang, M. Zhao // *Acta Biochim Biophys Sin.* — 2011. — Vol. 43.Issue 10. — P. 779–786.
630. Tanghe S. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization / S. Tanghe, A. Van Soom, H. Nauwynck, M. Coryn, A. de Kruif // *Mol. Reprod. Develop.* — 2002. — 61. — P. 414–424.
631. Tarkovsky A. K. An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs / A. K. Tarkovsky // *Cytogenetics.* — 1966. — Vol. 5. — P. 394–400.
632. Thanh N. T. K. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications / Thanh N. T. K., Green L. A. W. // *nano Today.* — 2010. — 5. — P. 213–230.
633. Tiffany M. Polymorphisms in human heat shock factor-1 and analysis of potential biological consequences / Tiffany M. Bridges, Rachel G. Scheraga, Mohan E. Tulapurkar, Dante Suffredini, Stephen B. Liggett, Aparna Ramarathnam, Ratnakar Potla, Ishwar S. Singh, Jeffrey D. Hasday // *Cell Stress Chaperones.* — 2015. — 20(1). — P. 47–59. doi: 10.1007/s12192-014-0524-5.
634. Toda S. A new organotypic culture of thyroid tissue maintains three-dimensional follicles with C cells for a long term / S. Toda, K. Watanabe, F. Yokoi, S. Matsumura, K. Suzuki, A. Ootani, S. Aoki, N. Koike, H. Sugihara // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2002. — Vol. 294(4). — P. 906–911.

635. Trinklein N.D. Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation / N.D. Trinklein, W.C. Chen, R.E. Kingston, R.M. Myers // *Cell Stress Chaperones*. — 2004. — 9. — P. 21-28.
636. Turner J. M.A. Meiotic sex chromosome inactivation / J.M. A. Turner // *Development*. — 2007. — 134. — P. 1823-1831. doi:10.1242/dev.000018
637. Turner J. M.A. Meiotic sex chromosome inactivation in male mice with targeted disruptions of Xist / J.M. A. Turner, S. K. Mahadevaiah, D. J. Elliott, H.-J. Garchon, J. R. Pehrson, R. Jaenisch, P. S. Burgoyne // *J. Cell Scienc.* — 2002. — 115. — P. 4097-4105.
638. Ueda H. Suppression of Pyk2 kinase and cellular activities by FIP200 / H. Ueda, S. Abbi, C. Zheng, J.L. Guan // *J. Cell Biol.* — 2000. — 149(2). — P. 423-30.
639. Ugwuja E. I. Plasma copper and zinc among pregnant women in Abakaliki, Southeastern Nigeria / E. I. Ugwuja, E. I. Akubugwo, U. Ibiam, O. Obodoa // *Internet J. Nutrit. Wellness*. — 2010. — Vol. 10, № 1. — P. 75-81.
640. Vajta G., Kuwayama M. Improving cryopreservation systems / G. Vajta, M. Kuwayama // *Theriogenology*. — 2006. — 65. — P. 236–244.
641. Van de Mark D. Mdm1 is a microtubule-binding protein that negatively regulates centriole duplication / D. Van de Mark, D. Kong, J. Loncarek, T. Stearns // *Mol. Biol. Cell*. — 2015. — 26(21). — P. 3788-3802.
642. Van der Heijden Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation / G. W. van der Heijden, Derijck, A. A. H. A., E. Pósfai, M. Giele, P. Pelczar, L. D. Ramos, G. Wansink, J. van der Vlag, A. H. F. M. Peters, P. de Boer // *Nat. Genet.* — 2007. — 39. — P. 251-258.
643. Van Wagtendonk-de Leeuw Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status / Van Wagtendonk-de Leeuw // *Theriogenology*. — 2006. — 65(5). — P. 914-925.

644. VanGompel M.J.W. The role of the DAZ family in spermatogenesis. More than just translation? / M.J.W. VanGompel, E.Y. Xu // *Spermatogenesis*. — 2011. — 1(1). — P. 36-46.
645. Vashchenko G. Multi-copper oxidases and human iron metabolism / G. Vashchenko, R. T. MacGillivray // *Nutrients*. — 2013. — 5(7). — P. 2289-2313.
646. Vassiliev V. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases / V.Vassiliev, Z.L. Harris, P. Zatta // *Brain Res. Brain Res. Rev.* — 2005. — Vol. 49, № 3. — P. 633-640.
647. Verhagen T. E. The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization : a meta-analysis / T. E. Verhagen, D. J. Hendriks, L. F. Bancsi [et al.] // *Hum. Reprod. Update*. — 2008. — Vol. 14, N 2. — P. 95–100.
648. Vihervaara A. Transcriptional response to stress in the dynamic chromatin environment of cycling and mitotic cells / A. Vihervaara, C. Sergelius, J. Vasara, M.A.H. Blom, A.N. Elsing, P. Roos-Mattjus, L. Sistonen // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013. — 110. — P. E3388-E3397.
649. Vydra N. Spermatocyte-specific expression of constitutively active heat shock factor 1 induces HSP70i-resistant apoptosis in male germ cells / N. Vydra E. Malusecka, M. Jarzab, K. Lisowska, M. Glowala-Kosinska, K. Benedyk, P. Widlak, Z. Krawczyk, W. Widlak // *Cell Death Differ.* — 2006. — 13. — P. 212-222.
650. Walter S. Molecular chaperones—cellular machines for protein folding / S. Walter, J Buchner // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2002. — 41. — P. 1098–1113.
651. Wan L. Cadmium toxicity: effects on cytoskeleton, vesicular trafficking and cell wall construction / L. Wan, H. Zhang // *Plant Signal Behav.* — 2012. — Vol. 7, no 3. — P. 345–348.
652. Wang B. Transgenic goats produced by DNA pronuclear microinjection of in vitro derived zygotes / B. Wang, H. Baldassarre, T. Tao, M. Gauthier, N. Neveu, J.F. Zhou, M. Leduc, F. Duguay, A.S. Bilodeau, A. Lazaris, C. Keefer,

- C.N..Karatzas // *Mol. Reprod. and Develop.* — 2002. — 63(4). — P. 437–443.  
doi: 10.1002/mrd.10199.
653. Wang Chunxin The role of mitochondria in apoptosis / Wang Chunxin, R. J. Youle // *Annual Review of Genetics.* — 2009. — Vol.43. — P. 95–118.
654. Wang G. Essential requirement for both hsf1 and hsf2 transcriptional activity in spermatogenesis and male fertility / G. Wang, Z. Ying, X. Jin, N. Tu, Y. Zhang, M. Phillips, D. Moskopididis, N.F. Mivechi // *Genes NYN.* — 2004. — 38. — P. 66-80.
655. Wang W. J. The conversion of centrioles to centrosomes: essential coupling of duplication with segregation / W.J. Wang, R.K. Soni, K. Uryu, M.F. Bryan Tsou // *J Cell Biol.* — 2011. — 193. — P. 727–739.
656. Wang X. MdmX protein is essential for Mdm2 protein-mediated p53 polyubiquitination / X. Wang, J. Wang, X. Jiang // *J Biol Chem.* — 2011. — 286. — P. 23725–23734.
657. Wang X.W. Gestational age and dose influence on placental transfer of  $^{63}\text{Ni}$  in rats / X.W. Wang, J.Y. Gu, Z. Li, Y.F. Song, W.S. Wu, Y.P. Hou // *Placenta.* — 2010. — Vol. 31. — P. 305–311.
658. Wathlet S. Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. / S. Wathlet [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2011. — Vol. 26, № 5. — P. 1035-1051.
659. Wegele H. Hsp70 and Hsp90-a relay team for protein folding / H. Wegele, L. Müller, J. Buchner // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* — 2004. — Vol. 151. — P. 1–44.
660. Wendy K. Cell adhesion and growth on coated or modified glass or plastic surfaces / K. Wendy, W. K. Scholz // *Technical Bulletin.* — 2010. — 13. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/D00253.pdf>.
661. Widak W. Expression of a constitutively active mutant of heat shock factor 1 under the control of testis-specific hst70 gene promoter in transgenic mice induces degeneration of seminiferous epithelium / W. Widak, K. Benedyk, N.

- Vydra, M. Gowala, D. Scieglińska, E. Mausecka, A. Naka, Z. Krawczyk // *Acta Biochimica Polonica*, 2003. — Vol. 50(2). — P. 535-541.
662. Widak W. Heat shock transcription factor 1 down-regulates spermatocyte-specific 70 kDa heat shock protein expression prior to the induction of apoptosis in mouse testes / W. Widak, N. Vydra, E. Mausecka, V. Dudaladava, B. Winiarski, D. Scieglinska, P. Widlak // *Genes to Cells*. — 2007. — 12. — P. 487-499.
663. Widlak W. In vivo electroporation of the testis versus transgenic mice model in functional studies of spermatocyte-specific hst70 gene promoter. A comparative study / W. Widlak, D. Scieglinska, N. Vydra, E. Malusecka, Z. Krawczyk // *Mol. Reprod. Dev.* — 2003b. — 65.
664. Wilkins J. F. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression / J. F. Wilkins, D. Haig // *Nat. Rev. Genet.* — 2003. — 4 . — P. 1—10.
665. Wójcik J. Antepartum/postpartum depressive symptoms and serum, zinc and magnesium levels / J. Wójcik, D. Dudek, M. Schlegel-Zawadzka [et al.] // *Pharmacol. Rep.* — 2006. — Vol. 58. — P. 571-576.
666. Wu L. Z. Cidea controls lipid droplet fusion and lipid storage in brown and white adipose tissue / LZ Wu, LK Zhou, C Chen, JY Gong, L Xu, J Ye, D Li, P Li. // *Sci China Life Sci.* — 2014. — 57. — P. 107–116, doi: 10.1007/s11427-013-4585.
667. Xu W. Differential roles of cell death-inducing DNA fragmentation factor- $\alpha$ -like effector (CIDE) proteins in promoting lipid droplet fusion and growth in subpopulations of hepatocytes / W. Xu, L. Wu, M. Yu, F-J. Chen, M. Arshad [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2016. — 291(9). — P. 4282-4293.
668. Yakugaku Z. Zinc deficiency and clinical practice – validity of zinc preparations / Z. Yakugaku, H. Yanagisawa // *J. Pharm. Society of Japan*. — 2008. — Vol. 128, №3. — P. 333-339.
669. Yamada R. T. Intrauterine growth restriction and zinc concentrations in term infants during the first month of life / R. T. Yamada, C. R. Leone // *J. Am. Coll. Nutr.* — 2008. — Vol. 27, N 4. — P. 485–491.

670. Yamamoto A. Generic tendency of metal salt cytotoxicity for six cell lines / A. Yamamoto, R. Honma, A. Tanaka, M. Sumita // *Biomed Mater Res.* — 1999. — Vol. 47. — P. 396–403.
671. Yamamoto K. Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1 / K. Yamamoto, M. Sonoda // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2003. — 301. — P. 287–292.
672. Yanez L. Z. Microfluidic analysis of oocyte and embryo biomechanical properties to improve outcomes in assisted reproductive technologies / L.Z. Yanez, D.B.Camarillo // *Mol. Hum. Reprod.* — 2017. — Vol. 23(4). — P. 235–247. doi: 10.1093/molehr/gaw071.
673. Ye J. Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B / J. Ye, J.Z. Li, Y. Liu, X. Li, T. Yang, X. Ma, Q. Li // *Cell Metab.* — 2009. — 9. — P. 177–190.
674. Ye J. Gene expression profile in response to chromium-induced cell stress in A549 cells / J. Ye, X. Shi // *Mol. Cell Biochem.* — 2001. — 222(1–2). — P. 189–197.
675. Yokota Y. Birth of a healthy baby following vitrification of human blastocysts / Y. Yokota, S. Sato, M. Yokota, H. Yokota, Y. Araki // *Fertility and Sterility.* — 2001. — 75(5). — P. 1027–1029. doi: 10.1016/s0015-0282(01)01685-5.
676. Yonezawa T., Kurata R., Kimura M., Inoko H. Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism / T. Yonezawa, R. Kurata, M. Kimura, H. Inoko // *Mol. BioSyst.* — 2011. — 7. — P. 91–100. doi: 10.1039/c0mb00099j
677. Yu S. Y. Stable and pH-sensitive nanogels prepared by selfassembly of chitosan and ovalbumin / S. Y. Yu, J. H. Hu, X. Y. Pan // *Langmuir.* — 2006. — Vol. 22. — P. 2754–2759.
678. Yu Z. K. MDM2-dependent ubiquitination of nuclear and cytoplasmic P53 / Z. K. Yu, R. K. Geyer, C. G. Maki // *Oncogene.* — 2000. — 19(51). — P. 5892–7.
679. Yu W. Preconception urethane or chromium(III) treatment of male mice: multiple neoplastic and non-neoplastic changes in offspring / W. Yu, M. A.



- Sipowicz, D. C. Haines, L. Birely, B. Diwan, C. W. Riggs, K. S. Kasprzak, L. M. Anderson // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* — 1999. — 158. — P. 161–176.
680. Yuan L. The murine Scp3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility / L. Yuan, J.G. Liu, J. Zhao, E. Brundell, B. Daneholt, C. Hoog // *Mol. Cell.* — 2000. — 5. — P. 73–83.
681. Yung Y. Localization of luteinizing hormone receptor protein in the human ovary / Y. Yung [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 2014. — Vol. 20, № 9. — P. 844–849.
682. Zadrozna M. Antioxidants activities and concentration of selenium, zinc and copper in preterm and IUGR human placentas / M. Zadrozna, M. Gawlik, B. Nowak [et al.] // *J. Trace Elem. Med. Biol.* — 2009. — Vol. 23, N 2. — P. 144–148.
683. Zhang M. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. / M. Zhang [et al.] // *Science.* — 2010. — Vol. 330, № 6002. — P. 366–369.
684. Zhang S. Cidea control of lipid storage and secretion in mouse and human sebaceous glands / S. Zhang, G. Shue, G. Wang, C. Wang, S. Sun, C.C. Zouboulis, R. Xiao, J. Ye, P. Li // *Mol. Cell. Biol.* — 2014, doi:10.1128/MCB.01723-13.
685. Zhang Yin-Li DCAF13 promotes pluripotency by negatively regulating SUV39H1 stability during early embryonic development / Yin-Li Zhang, L-W. Zhao, J. Zhang, R. Le, S-Y. Ji, C. Chen, Y. Gao, D. Li, S. Gao, H-Y. Fan, V.K. Rao // *The EMBO Journal.* — 2018. — Vol. 37(18).
686. Zheng F. Regulation of male fertility by X-linked genes / F. Zheng, P.J. Yang // *J. Androl.* — 2010. — V. 31. — P. 79–84.
687. Zhang S. Biomimetic layer-by-layer self-assembly of nanofilms, nanocoatings and 3D scaffolds for tissue engineering / S. Zhang, M. Xing, B. Li // *Int. J. Mol. Sci.* — 2018. — 19 (6). — P. 1641. doi: 10.3390/ijms19061641.
688. Zimmermann M.B. The Effects of Iodine Deficiency in Pregnancy and Infancy / M.B. Zimmermann // *Paediatric and Perinatal Epidemiology.* — 2012. — Vol. 26. — P. 108—117.

689. Zini A. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI / A. Zini, J. Meriano, K. Kader, K. Jarvi, C.A. Laskin, K. Cadesky // Hum Reprod. — 2005. — 20(12). — P. 3476–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123087>.
690. Zoroddu M. A. Molecular mechanisms in nickel carcinogenesis: modeling Ni(II) binding site in histone H4 / M. A. Zoroddu, L. Schinocca, T. Kowalik-Jankowska Kozłowski, K. Salnikow, M. Costa // Environ Health Perspect. — 2002. — Vol. 110 (5). — P. 719–23.
691. Zykova A. Surface parameters modification by multilayer coatings deposition for biomedical applications / A. Zykova, V. Safonov, O. Virva et al. // J. of Physics Conference Series, IOP Publishing. — 2008. — V. 113. — P. 15 – 19.

## ДОДАТКИ

### Список публікацій здобувача

1. **Штапенко О. В.** Особливості цитотоксичного впливу кадмій хлориду на клітини *in vitro* // О. В. Штапенко, І. І. Гевкан, Ю. І. Сливчук // Біологія тварин. — 2018. — Том 20, №1. — С. 123-130 (Журнал включено до таких баз даних: Index Copernicus; Google Scholar; eLIBRARY.RU; J-Gate; Open Academic Journals Index; Universal Impact Factor, Укр. Реферативному журналі «Джерело») (Прийнято участь у проведенні експериментальної частини досліджень та у підготовці статті до друку).

2. **Штапенко О. В.** Вплив хлориду нікелю на морфофункціональні та метаболічні характеристики клітин *in vitro* / О. В. Штапенко, Ю.І. Сливчук, І. І. Гевкана // «Наукові записки Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. — 2018. — № 2(73). — С. 68-73 (Журнал включено до таких наукометричних баз даних: Index Copernicus з ICV 2015: 45.81; Directory of Research Journals Indexing; Journal Factor; Open Academic Journals Index; Scientific Indexing Services; Google Scholar) (Прийнято участь у проведенні експериментальної частини досліджень та у підготовці статті до друку).

3. **Штапенко О. В.** Вплив органічної сполуки манган глютамату на імплантаційну здатність самок щурів / О. В. Штапенко, І.І. Гевкан, Ю. І. Сливчук, В.Я. Сирватка, Н.М. Матвієнко // Вісник проблем біології та медицини. — 2018. — Том 9, Вип. 2. — С. 171-175 (Журнал включено до таких наукометричних баз даних: Index Copernicus, Russian Science Citation Index, Google Scholar, Cyberleninka) (Проведено експериментальну частину досліджень, статистичну обробку даних та підготовлено статтю до друку).

4. **Shtapenko O. V.** Formation and properties polymer nanolayers to enhance cell growth *in vitro* / O. V. Shtapenko, I. I. Gevkan, Yu. I. Sluvchyk, V. Y. Syrvatka, N. M. Matvienko // Innow. Biosyst. Bioeng. — 2018. — Vol. 2, no. 2. — P. 105-109 (Журнал включено до таких наукометричних баз даних:

DOAJ; ROAD; CNKI Scholar; Public Knowledge Project Index; JournalTOCs; WCOSJ; Vifabio; EZB; Zeitschriftendatenbank; Polska Bibliografia Naukowa; Scilit; Bielefeld Academic Search Engine; OpenAir; WorldCat) *(Виконано експериментальну частину, проведено статистичну обробку даних та їх аналіз).*

**5. Shtapenko O. V.** Effect of organic microelements liposomal form on fertilizing ability and antioxidant status of female rabbits / O. V. Shtapenko, I. I. Gevkan, Yu. I. Sluvchyk, Ye. O. Dzen`, V. Y. Syrvatka, N. M. Matvienko // *Biotechnologia Acta.* – 2018. — Т. 11, № 4. — С. 50-56 (Журнал включено до таких науковометричних баз даних: CrossRef; DOAJ; Google Scholar, OAJI; JournalTOCs; GIGA Information Centre; InfoBase Index; Index Copernicus; SIS; Cyberleninka; ResearchBib; WorldCat; ProQuest; Cornell University Albert R. Mann Library; EBSCO; NEICON; Citefactor; e-LIBRARY; Укр. Реферативний журнал «Джерело») *(Виконано експериментальну частину, проведено статистичну обробку даних та їх аналіз).*

**6. Штапенко О. В.** Ефективність ДНК інтеграції і виживаність зигот мишей за умов пронуклеарної мікроін'єкції / О. В. Штапенко, А.В. Мадіч, С. В. Федорова // *Вісник Львівського університету ім. Івана Франка. Серія біологічна.* — 2017. — Вип. 76. — С. 45-53 (Журнал включено до Thomson Scientific Master Journal List (список ISI) *(Виконано експериментальну частину, проведено статистичну обробку даних та їх аналіз).*

**7. Shtapenko O.** The influence of surfaces modified by different polymeric on the growth of mouse embryonic fibroblasts cell line NIH3T3 // *Біологія тварин.* — 2017. — Том 19, №2. — С. 121-126 (Журнал включено до таких баз даних: Index Copernicus; Google Scholar; eLIBRARY.RU; J-Gate; Open Academic Journals Index; Universal Impact Factor, Укр. Реферативному журналі «Джерело») *(Виконано експериментальну частину, проведено статистичну обробку даних та їх аналіз).*

**8. Штапенко О. В.** Вплив об'ємної клітинної системи на дозрівання ранніх ембріонів мишей *in vitro* / О. В. Штапенко, Н.М. Матвієнко //

«Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)». — 2017. — Том 9, Вип. 1. — С. 51-56 (Журнал включено до таких баз даних: Open Journal Systems) *(Виконано експериментальну частину, проведено аналіз одержаних даних, написано статтю).*

9. **Штапенко О. В.** Обмін речовин за стимуляції відтворювальної здатності кролиць препаратом органічних мікроелементів у формі ліпосомальної емульсії / О. В. Штапенко, І.І. Гевкан, Ю. І. Сливчук, В.Я. Сирватка // «Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)». — 2017. — Том 9, Вип. 2. — С. 171-175 (Журнал включено до таких баз даних: Open Journal Systems) *(Проведено дослідження та аналіз одержаних даних, написано статтю).*

10. **Shtapenko O.** Development of non- and vitrified-thawed pronuclear-stage mouse embryos co-cultured with oviduct epithelial cells / O. Shtapenko, S. Fyodorova, A. Madich // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. — 2013. — Вип. 2(64). — С. 15-17 (Журнал включено до таких баз даних: Academic Keys, CiteFactor, Directory of Open Access Journals, E-Library.ru, Hinari, Geneva Foundation for Medical Education and Research, Index Copernicus, Open Academic Journal Index, Quality Open Access Market, ResearchBib, Ulrich's Periodicals, WorldCat) *(Прийнято участь у проведенні експериментальної частини досліджень та у підготовці статті до друку).*

11. Огар М. Формування та властивості декстрановмісного покриття для контрольованої адсорбції альбуміну та вирощування клітин / М. Огар, Ю. Стецишин, А. Коструба, Н. Марінцова, Л. Журахівська, С. Федорова, **О. Штапенко**, В. Новіков // ДАН України. — 2013. — №5. — С. 511-517 *(Прийнято участь у проведенні експериментальної частини досліджень та у підготовці статті до друку).*

12. Федорова С.В. Проліферативний ріст та біохімічні зміни кондиційного середовища як показники функціональності за культивування клітин яйцепроводів кролів на модифікованих покриттях / С.В. Федорова,

**О.В. Штапенко, І.І. Гевкан, І.О. Матюха, О. Жолобко, М. Огар, Ю.Б. Стецишин, Ю. І. Сливчук** // Біологія тварин. — 2013. — Том 15, №4. — С. 134-140 (Журнал включено до таких баз даних: Index Copernicus; Google Scholar; eLIBRARY.RU; J-Gate; Open Academic Journals Index; Universal Impact Factor, Укр. Реферативному журналі «Джерело») *(Опрацьовано дані літератури та власних досліджень і проведено їх узагальнення).*

13. **Штапенко О.** Вплив гіпертермії на експресію генів у тканинах мишей // Вісник Львівського університету ім. Івана Франка. Серія біологічна. — 2013. — Вип. 62. — С. 126-132 (Журнал включено до Thomson Scientific Master Journal List (список ISI) *(Виконано експериментальну частину, проведено статистичну обробку даних та їх аналіз).*

14. **Штапенко О.В.** Вплив хром метіоніна на проліферативний ріст культури клітин ембріонального фібробласту / О.В. Штапенко // Аграрний вісник Причорномор'я / Збірник наукових праць. — 2012 — Вип. 62. — С. 158-162.

15. **Штапенко О.** Вплив модифікованих поверхонь скла на адгезію та проліферацію клітин меланоми миші лінії B16F10 / О. Штапенко, С. Федорова, І. Гевкан, Ю. Стецишин, О. Жолобко, М. Огар // Біологія тварин. — 2011. — Т. 13, №1-2. — С.484-487 (Журнал включено до таких баз даних: Index Copernicus; Google Scholar; eLIBRARY.RU; J-Gate; Open Academic Journals Index; Universal Impact Factor, Укр. Реферативний журнал «Джерело») *(Проведено дослідження та аналіз одержаних даних).*

16. Федорова С.В. Вміст ТБК-активних продуктів і гідроперекисів ліпідів та активність ферментів антиоксидантного захисту в гомогенатах внутрішніх органів самиць щурів при стимуляції ембріонально-маткового сигналу за умов введення селенвмісного препарату / С.В. Федорова, І.І. Гевкан, **О.В. Штапенко**, Ю. І. Сливчук // Біологія тварин. — 2010— Том 12, №1. — С. 100-105 (Журнал включено до таких баз даних: Index Copernicus; Google Scholar; eLIBRARY.RU; J-Gate; Open Academic Journals Index; Universal Impact Factor, Укр. Реферативному журналі «Джерело») *(Прийнято*

*участь у проведенні експериментальної частини досліджень та у підготовці статті до друку).*

17. **Штапенко О.В.** Проліферативний ріст фідерних клітин яйцепроводів у культурі при дії хлоридів кадмію, міді та нікелю/ О.В. Штапенко // Аграрний вісник Причорномор'я. — 2010. — Вип.52. — С.104-108.

18. Мадіч А. Особливості одержання культури клітин ембріонального фібробласту овець / А. Мадіч, С. Федорова, І. Гевкан, Р. Кхан, **О. Штапенко**, Ю. Сливчук // Вісник Львівського університету ім. Івана Франка. Серія біологічна. — 2007. — Вип. 45. — С. 175-180 (Журнал включено до Thomson Scientific Master Journal List (список ISI) *(Прийнято участь у проведенні експериментальної частини досліджень та у підготовці статті до друку).*

19. Raczkowska J. Temperature-responsive peptide-mimetic coating based on poly(N-methacryloyl-L-leucine): properties, protein adsorption and cell growth / M. Ohar, Yu. Stetsyshyn, Zemla J., K. Awsiuk, J. Rysz, K. Fornal, A. Bernasik, H. Ohar, S. Fedorova, **O. Shtapenko**, S. Polovkovych, V. Novikov, A. Budkowski // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. — 2014. — 118. — P. 270-279 (Журнал включено до таких баз даних: ELSEVIER, IF 3,9967; Chemical Abstracts; Current Contents/Physics,&Earth Sciences; INSPEC; PASCAL/CNRS; EMBiology; Applied Polymers Literature; APOLLIT; EMBASE; Scopus) *(Виконано експериментальну частину на культурі клітин, проведено статистичну обробку даних та їх аналіз).*

20. **Shtapenko O.** Comparative toxicity screening of organic and inorganic copper salts on oviduct epithelial cell culture in vitro / O. Shtapenko, I. Hevkan, S. Fedorova, Yu. Slyvchuk, I. Matuha, V. Syrvatka // Living organism s and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds. — Rzeszów, 2015. — P. 215-223 *(Проведено експериментальну частину досліджень, узагальнено одержані результати та написано статтю).*



21.**Shtapenko O.** Effect of liposomal prepartate with some organic trace elements on antioxidant status and reproductive ability of female rabbits / O. Shtapenko, I. Gevkan, Ye. Dzen`, S. Fedorova, Yu. Sluvchyk, V. Syrvatka, I. Matiukha // Scientific Papers. Series D. Animal Science. Vol. LVIII, 2015 ISSN 2285-5750. — P. 221-227 (Журнал включено до таких баз даних: Web of Science Core Collection (THOMSON REUTERS); Index Copernicus; CABI; DOAJ; Ulrich's Periodicals Directory; Google Scholar; PBN; OCLC (WorldCat); CITE RACTOR (Academic Scientific Journals); SCPIO; Research Bible) *(Прийнято участь у проведенні експериментальної частини досліджень та у підготовці статті до друку).*

22.**Shtapenko O.** The influence of trace elements in the form of liposomal compounds on antioxidant defense system and parameters of oxidative stress in the reproductive organs of female rabbits / O. Shtapenko, I. Matiukha, I. Hevkan, H. Tkachenko // Slupskie Prace Biologiczne — 2015. — № 12. — P. 173-186 (Журнал включено до таких баз даних: Web of Science Core Collection (THOMSON REUTERS); Index Copernicus) *(Проведено експериментальну частину досліджень, проведено аналіз отриманих результатів та прийнято участь у підготовці статті до друку).*

23.Mikolajec M. The heat shock regulates *Mdm1* gene expression in spermatocytes / M. Mikolajec, A. Wojtas, O. Shtapenko, J. Korfanty, M. Kus-Liskiewicz, N. Vydra, A. Toma, W. Widlak // XLV Annual Meeting of the Polish Biochemical Society (September 20-23, 2010, Wisla, Poland). — 2010. — P. 133.

24. Kus-Liskiewicz M. Hsf1, the main regulator of the heat shock response, can act as transcriptional repressor / M. Kus-Liskiewicz, J. Polańska, M. Olbryt, J. Korfanty, A. Wojtas, O. Shtapenko, N. Vydra, A. Toma, W. Widlak // XIVth Gliwice Scientific Meetings (November 26-27, 2010, Gliwice, Poland). — 2010. — P. 71.

25. Mikolajec M. *Mdm1* gene expression in spermatocytes is regulated by the heat shock transcription factor 2 / M. Mikolajec, A. Wojtas, O. Shtapenko, J.

Korfanty, M. Kus-Liskiewicz, N. Vydra, A. Toma, W. Widlak // XIVth Gliwice Scientific Meetings ( November 26-27, 2010, Gliwice, Poland). — 2010. — P. 73.

26. Штапенко О.В. Стимуляция репродуктивной функции кролематок и оценка их физиолого-биохимических показателей крови при воздействии хром-метионина / О.В. Штапенко, Е.А. Дзень, С.В. Фёдорова // XV междунар. научно-практическая конф. «Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства», (октябрь 2012, г. Горки). — С. 60-65.

27. Федорова С. Пролиферативный рост как показатель функциональности и отсутствия цитотоксичности модифицированных нанопокровов при культивировании клеток эмбриональных фибробластов мышей линии *NIH3/T3* / С. Федорова, О. Штапенко, И. Гевкан, Ю. Стецишин, О. Жолобко, М. Огар // Сборник материалов. Ставрополь, Россия. — 2012.— С. 199-203.

28. Штапенко О.В. Аналіз рівня експресії генів у сім'яниках мишей за дії теплового шоку // Тези доповідей VI Міжнар. конф. молодих вчених “Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.” (13-17 травня, 2013 р., м. Одеса). — Збірник наук. матеріалів Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова — 2013. — С. 301.

29. Shtapenko O. Survival and development of pronuclear-stage mouse embryos after droplet vitrification in different vitrification solutions / O. Shtapenko, S. Fyodorova, A. Madich // «Mammalian Embryology Conference. Celebrating Work of Professor Andrzej K. Tarkowski» (25-26 October 2013 Warsaw, Poland). — 2013. — P. 55.

30. Ohar M. Formation, structure and properties grafted sensitive polymer nanolayers on the base of the amino-acid derivatives / M. Ohar, Y. Stetsyshyn, A. Kostruba, J. Raczkowska, N. Marintsova, S. Fyodorova, O. Shtapenko, V. Novikov // International conference «Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2013)» (25 August-1 September 2013, Bukovel, Ukraine). —Abstract book – Bukovel, Ukraine. — 2013. —P. 299.

31. Огар М. Формування біосумісних термочутливих полімерних покриттів на основі полі(N-метакрилоїл-L-фенілаланіну) / М. Огар, Ю. Стецишин, А. Коструба, Н. Марінцова, С. Федорова, О. Штапенко, В. Новіков // Національна науково-технічна інтернет-конференція з міжнародною участю «Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно-активних сполук та фармацевтичних препаратів» (23-25 квітня 2013 р. Львів). – С.58.

32. Огар М.О. Біологічно- активні прищеплені полімерні наночастиці полі(N-метакрилоїл-L-амінокислот) на поверхні скла / М. Огар, Ю. Стецишин, Н. Марінцова, С. Федорова, О. Штапенко, В. Новіков // Збірник тез доповідей IX Міжнародної конференції da Rostim 2013. “Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища” (7-10 Жовтня 2013, м. Львів). – Тези допов. Львів: Нац. ун-т “Львівська політехніка”. – 2013.– С.99-100.

33. Raczkowska J. Temperature-responsive peptide-mimetic coating based on poly(N-methacryloyl-L-leucine): Properties, protein adsorption and cell growth / J. Raczkowska, M. Ohar, Yu. Stetsyshyn, J. Zemła, K. Awsiuk, J. Rysz, K. Fornal, A. Bernasik, H. Ohar, S. Fedorova, O. Shtapenko, Svyatoslav Polovkovych, Volodymyr Novikov, Andrzej Budkowski // 8<sup>th</sup> ECNP International Conference on Nanostructured Polymers and Nanocomposites (September 14-16, 2013, Dresden, Germany). – P. O30.

34. Штапенко О. В. Клонування гену *mdm 1* мишей та його експресія у трансформованих клітинах // Український біохімічний конгрес (6-10 жовтня 2014, м. Київ). – 2014.– Т. 86, № 5 (1). – с. 229.

35. Shtapenko O. Influence of some organic trace elements on biochemical profile and reproductive function of female rabbits / /O. Shtapenko, I. Hevkan, Y. Dzen`, S. Fedorova, Y. Slyvchuk, V. Syrvatka, I. Matuha // KRMIVA 2014, 21th International Conference (4 - 6 June, 2014, Opatija Hrvatska, Croatia). – 2014.– P. 60.

36. Shtapenko O. The influence of chromium methionine supplementation on haematological and biochemical indices and reproductive function of female rabbits during early pregnancy / O. Shtapenko, I. Hevkan, Ye. Dzen`, S. Fedorova // 5th International Young Scientists Conference „Human – Nutrition – Environment” “Biotechnology for sustainable development” (24-25 April, 2014, Rzeszów, Poland). – 2014. – P. 60.

37. Shtapenko O. Effect of some microelements in liposomal forms on blood parameters in female rabbits during gestation / O. Shtapenko, I. Hevkan, Y. Dzen`, S. Fedorova, Y. Slyvchuk, V. Syrvatka, I. Matuha // International Scientific Symposium “Modern animal husbandry – strategies, opportunities and performances” (23-25 October, 2014, Iasi, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Romania). – 2014. – P. 36.

38. Штапенко О.В. Порівняння проліферативної здатності клітин ендометрію при культивуванні на біогелі та модифікованому альбуміном покритті / О.В. Штапенко, С.В. Федорова, Ю.Б. Стецишин // Міжнародно-науково-практична конференція “Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини” (2-3 жовтня 2014, м. Львів). – 2014. – С. 217.

39. Shtapenko O. Effect of the surfaces modified by different bioactive polymeric on the cell viability and proliferation / O. Shtapenko, S. Fedorova, I. Gevkan, Yev. Dzen`, Yu. Stetsyshyn // 9th International Conference – “Structure and Stability of Biomacromolecules” (SSB 2015). – Kosice, Slovakia. – 2015. – P. 128-129.

40. Shtapenko O. Changes in activities of antioxidant enzyme and biochemical indices in blood during gestation in rabbits under influence of some organic microelements in liposomal form / O. Shtapenko, Y. Dzen`, S. Fedorova, Y. Slyvchuk // XIIth International Conference of Young Researchers „Physiology and Biochemistry in Animal Nutrition” (23-24 September 2015, Łowicz, Poland). – 2015. – P. 58.

41. Shtapenko O. V. The impact of introduction organic microelements in liposomal form on oxidative stress biomarkers and antioxidant system in tissues of female rabbits / O. V. Shtapenko, , I. O. Matiukha, I. I. Gevkan // Біологія тварин. Тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини», присвяченої 55-річчю Інституту біології тварин НААН.– 2015. – Т. 17, № 3. – С. 188.

42. Shtapenko O. The influence of organic zinc, manganese and chromium in liposomal form on antioxidant status and pregnancy outcome in rabbits // 20th International Symposium on Housing and Diseases of Rabbits, Furproviding Animals and Pet Animals (May 17 - 18, 2017, Celle, German).

43. Штапенко О. В. Вплив просторово-організованої культуральної системи клітин гранульози на дозрівання ооцит-кумулясних комплексів / О. В. Штапенко, І. І. Гевкан, В. Я. Сирватка, Ю. І. Сливчук // Тези V Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2017). — 2017.

44. Shtapenko O. “Effect of zinc glutamate on embryogenesis of female rats” / Shtapenko O., Hevkan I., Dzen` Ye., Slyvchuk Y., Syrvatka V. // XXIV Symposium of immunology and reproduction with international participation (May 17-19, 2018, The Castle, Trest, Czech Rebuclia).

45. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / [ Влізла В.В., Федорук Р.С., Ратич І. Б., Штапенко О.В. та ін.]; за ред. В.В. Влізла. — Львів: Сполом, 2012. — 764 с.

46. Клітинні культури і можливості їх використання в ембріональній біотехнології: навчально-методичний посібник (рекомендовано Міністерством освіти і науки, спорту та молоді Лист МОНмолодьспорту № 1/11 від 13.01.2012 року) / А. В. Мадіч, В. І. Шеремета, І. І. Гевкан, С. В. Федорова, О. В. Штапенко, Ю. І. Сливчук; К.: АртЕконом, 2012. — 144 с.: іл..

47. Спосіб одержання фідерних клітин яйцепроводів: деклар. пат. на корис. модель 47452, Україна / Мадіч А.В., Гевкан І. І., **Штапенко О.В.**, Сливчук

Ю.І., Федорова С. В.; № u200904658 заявл. 12.05.2009; опубл. 10.02.2010, Бюл. №3.

48. Спосіб зниження рівня ембріональної смертності у кролематок: деклар. пат. на корис. модель 56695, Україна / **Штапенко О.В.**, Гевкан І. І., Дзень Є. О., Федорова С. В. № u20108053 заявл. 29.06.2010; опубл. 25.01.2011, Бюл. №2.

49. Спосіб активації проліферативних процесів в культурі клітин епітелію яйцепроводів: деклар. пат. на корис. модель 51687, Україна / Гевкан І. І., Нікітенко А.М., **Штапенко О.В.**, Сливчук Ю.І., Федорова С. В. № u201001506 заявл. 15.02.2010; опубл. 26.07.2010, Бюл. № 14.

50. Середовище для підвищення активності проліферації клітин різних типів: деклар. пат. на корис. модель 54749, Україна / Сливчук Ю.І., Гевкан І.І., **Штапенко О.В.**, Федорова С.В. № u201005025; опубл. 25.11.2010, Бюл. № 22.

51. Препарат «Ліпорганік» для підвищення відтворювальної здатності кролематок: деклар. пат. на корис. модель 105740, Україна / **Штапенко О.В.**, Гевкан І. І., Сливчук Ю.І., Дзень Є. О., Сирватка В. Я., Матюха І. О., Федорова С. В. № u201505160 заявл. 26.05.2015; опубл. 11.04.2016, Бюл. № 7.

52. Отримання функціоналізованих наноповерхонь для культивування клітин, ооцит-кумулюсних комплексів та ембріонів тварин: метод. реком.; затв. вченою радою Інститут біології тварин (протокол №5 від 16.09.2015 р.) / **О. В. Штапенко**, І.І. Гевкан, Ю. Б. Стецишин, С. В. Федорова, Ю. І. Сливчук, В. Я. Сирватка; «ДНДКІ ВП КД». Львів, 2015. 28 с.

53. Технічні умови ТУ 21.2-30995014-00:2018 Препарат «Ліпоорганік»

### Апробація результатів дисертації

Результати роботи доповідались на:

- XLV конгресі Польського біохімічного товариства (Wisla, 2010) публікація та стендова доповідь;
- XIVth Науковій зустрічі «Gliwice Scientific Meetings» (Gliwice, Poland, 2010) публікація та стендова доповідь;
- VI Міжнародній конференції молодих вчених “Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.” (Одеса, 2013) публікація та усна доповідь;
- Міжнародній конференції приуроченій професору А. К. Тарковському «Mammalian Embryology Conference» (Warsaw, 2013) публікація та стендова доповідь;
- Міжнародній конференції «Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2013)» (Буковель, 2013) публікація та усна доповідь;
- IX Міжнародній науковій конференції da Rostim 2013. “Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища” (Львів, 2013) публікація та стендова доповідь;
- 8th Міжнародній конференції ECNP «Nanostructured Polymers and Nanocomposites» (Dresden, 2013) публікація та стендова доповідь;
- 5-й Міжнародній конференції молодих вчених „Human – Nutrition – Environment” “Biotechnology for sustainable development” (Rzeszów, 2014) публікація та усна доповідь;
- Міжнародному науковому симпозиумі “Modern animal husbandry – strategies, opportunities and performances” (Iasi, Romania, 2014) (публікація);
- Міжнародній науково-практичній конференції “Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини” (Львів, 2014) публікація та усна доповідь;
- 9th Міжнародній конференції “Structure and Stability of

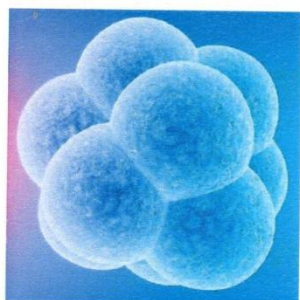
Biomacromolecules” (SSB 2015) (Kosice, Slovakia, 2015) (публікація) ,

➤ XII Міжнародній конференції молодих вчених „Physiology and Biochemistry in Animal Nutrition” (Łowicz, Poland, 2015) публікація та стендова доповідь;

➤ Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини», присвяченій 55-річчю Інституту біології тварин НААН (Львів, 2015) публікація та усна доповідь;

➤ XXIV симпозіумі по імунології та репродукції з міжнародною участю (The Castle, Trest, Czech Republic, 2018) усна доповідь.





НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

**ОТРИМАННЯ ФУНКЦІОНАЛІЗОВАНИХ НАНОПОВЕРХОНЬ ДЛЯ  
КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН, ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ  
КОМПЛЕКСІВ ТА ЕМБРІОНІВ ТВАРИН**

Методичні рекомендації



ЛЬВІВ - 2015

У методичних рекомендаціях наведено дані з впливу різних нанопокриттів на проліферацію клітинних культур з визначенням життєздатності культур, метаболізму культивованих клітин, адаптації клітин до умов культивування клітин в просторово-організований системі. На основі порівняльних даних застосовано найбільш ефективні наноповерхні для створення об'ємної культуральної системи з використанням культур клітин маткового походження для дозрівання ооцит-кумуляусних комплексів та розвитку ембріонів до трансферабельних стадій в умовах *in vitro*.

Рекомендації призначені для науковців, викладачів, аспірантів та фахівців у галузі клітинної біології.

Розглянуто, схвалено і рекомендовано до видання вченою радою Інституту біології тварин НААН ( протокол № 5 від 16 вересня 2015 р.).

Рекомендації підготували:

**Штапенко О.В.**, кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник лабораторії біотехнології відтворення ІБТ НААН;

**Гевкан І.І.** кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник лабораторії біотехнології відтворення ІБТ НААН;

**Степишин Ю.Б.** кандидат хімічних наук, доцент кафедри органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка»;

**Федорова С.В.**, молодший науковий співробітник лабораторії біотехнології відтворення ІБТ НААН;

**Сливчук Ю.І.**, кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник лабораторії біотехнології відтворення ІБТ НААН;

**Сирватка В.Я.**, науковий співробітник лабораторії біотехнології відтворення ІБТ НААН.

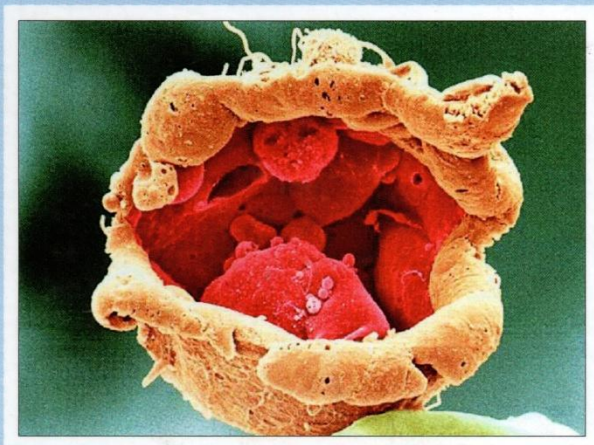
Рецензенти:

Завідувач лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії, гол. наук. співробітник, д. с.-г.н. Остапів Дмитро Дмитрович

Завідувач кафедри технології виробництва молока і яловичини Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, д. с.-г.н., професор Шаловило С. Г.

А. В. МАДІЧ, В. І. ШЕРЕМЕТА, І. І. ГЕВКАН,  
С. В. ФЕДОРОВА, О. В. ШТАПЕНКО, Ю. І. СЛИВЧУК

# КЛІТИННІ КУЛЬТУРИ І МОЖЛИВОСТІ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ В ЕМБРІОНАЛЬНІЙ БІОТЕХНОЛОГІЇ



НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК



ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН  
Національної академії аграрних наук України  
(Львівський науково-методичний центр фізіології  
і біохімії тварин)

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ  
Кабінет Міністрів України

АЛЛА ВСЕВОЛОДІВНА МАДІЧ  
ВІКТОР ІВАНОВИЧ ШЕРЕМЕТА  
ІВАН ІВАНОВИЧ ГЕВКАН  
СВІТЛАНА ВОЛОДИМИРІВНА ФЕДОРОВА  
ОКСАНА ВСЕВОЛОДІВНА ШТАПЕНКО  
ЮРІЙ ІВАНОВИЧ СЛИВЧУК

# КЛІТИННІ КУЛЬТУРИ І МОЖЛИВОСТІ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ В ЕМБРІОНАЛЬНІЙ БІОТЕХНОЛОГІЇ

НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК  
/ Під редакцією доктора с.-г. наук А. В. Мадіч /

Київ – Львів, 2012

УДК 602.4:591.3.04(072)

ББК 28.04я7

К49

Рекомендовано Міністерством освіти і науки, спорту та молоді України  
(Лист Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України № 1/11-429  
від 13.01.2012)

Рекомендовано Вченою радою Інституту біології тварин НААН України  
(Протокол засідання Вченої ради Інституту біології тварин НААНУ № 12 від  
16.12.2010)

Рекомендовано Вченою радою Національного університету біоресурсів  
і природокористування України  
(Протокол засідання Вченої ради НУБіП України № 3 від 31.10.2011)

Методичний посібник розроблено колективом авторів лабораторії ембріональної біотехнології Інституту біології тварин НААН спільно з доктором с.-г. наук, професором Національного університету біоресурсів і природокористування України *В. І. Шереметою* під редакцією доктора с.-г. наук *А. В. Мадіч* та адаптовано до навчального процесу.

У посібнику викладено методи отримання клітинних культур і субкультур, які дають можливість оволодіти культивуванням ембріонів і клітин дорослих організмів. Ці методи апробовано і частково адаптовано до умов вітчизняних лабораторій авторським колективом методичного посібника згідно зі стандартизованими протоколами провідних лабораторій Європи. До посібника увійшли матеріали відомого манускрипту *В. Hogan* та ін. "Маніпуляції з ембріонами мишей" (видання третє), який є незамінним для клітинних біологів, біотехнологів, генетиків і ембріологів усього світу. Протоколи відомого американського біотехнологічного Центру *Cold Spring Harbour Lab* використано для опрацювання методу одержання ліній ембріональних стовбурових клітин мишей. Чимало наукових розробок не увійшло до посібника через те, що вони є змістом численних патентів нашого авторського колективу. Автори використали інтернаціональну систему одиниць/позначень мір ваги і об'єму рідин. Методичний посібник призначений для наукових співробітників, ембріологів, фахівців-біотехнологів, викладачів і студентів вищих навчальних закладів з навчальним курсом біології ембріонального розвитку, репродуктивної біотехнології, генетики і селекції тварин, біологічної медицини. Сподіваємося, що посібник буде корисним в оволодінні методами одержання, культивування й використання клітинних систем з органів і ембріонів тварин, а також слугуватиме поглибленню наукових знань і досліджень у галузі клітинної біології, репродуктивної і ембріональної біотехнології та біомедицини.

Додаток Д

ДКПП 21.20.13-80.00

УКНД 11.220

**ПОГОДЖЕНО**

Директор ДНДКІ ветеринарних  
препаратів та кормових добавок  
д. вет. н., професор, академік НААН

І. Я. Коцюмбас

2018 рік

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Директор Інституту біології тварин  
НААН, д. вет. н., професор,  
академік НААН

В. В. Влізло

2018 рік



ПРЕПАРАТ "ЛІПОСОРТАНІК"

(розчин для ін'єкцій)

**Технічні умови**

ТУ У 21.2-30995014-00 :2018

(Введено вперше)

Дата надання чинності 2018

Чинні до

**ПОГОДЖЕНО**

Заступник директора ДНДКІ  
ветеринарних препаратів та кормових  
добавок, кандидат сільськогосподарських  
наук

Т. Р. Левицький

2018 рік

**РОЗРОБЛЕНО**

Старший науковий співробітник  
лабораторії репродуктивної  
біотехнології Інституту  
біології тварин НААН, к. с.-г.н.

О. В. Штапенко

2018 рік

Старший науковий співробітник  
лабораторії обміну речовин Інституту  
біології тварин НААН, к. с.-г.н.

Є. О. Дзень

2018 рік



## Додаток Е

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Директор Інституту  
біології тварин УААН  
Академік УААН

Візіо В.В.

2009 р.



ЗАТВЕРДЖУЮ:

Генеральний директор  
Тов «Карпатський панон»  
Мукачівського району  
Закарпатської області

Неміо О.О.

2009 р.



## АКТ

на виробничу перевірку закінчених  
науково-дослідних робіт (НДР)

1. Назва науково-дослідної установи: Інститут біології тварин УААН, лабораторія ембріональної біотехнології м. Львів, вул. В. Стуса, 38  
(НДІ, дослідна станція, відділ, лабораторія і інш.)

2. Назва закінчених НДР, які піддаються виробничій перевірці згідно з рішенням вченої ради (протокол № від „ „ р.): Розробити методи стимуляції ембріонально-маткового сигналу у свавців на основі вивчення механізму становлення на ранніх стадіях вагітності

3. Автори закінчених НДР: старший науковий співробітник лабораторії ембріональної біотехнології Інституту біології тварин УААН, к.с.-г. н. О.В.Штапенко, старший науковий співробітник лабораторії обміну речовин к.с.-г.н. Є.О. Дзень  
(прізвище, ім'я, по-батькові, посада, звання, наукова ступінь)

4. Виробнича перевірка проводилась: у приватному господарстві Тов «Карпатський панон» мукачівського району, Закарпатської області  
(назва господарства, підприємства, місце знаходження)

5. Відповідальні за проведення виробничої перевірки: старший науковий співробітник лабораторії ембріональної біотехнології Інституту біології тварин УААН, к.с.-г. н. О.В.Штапенко, старший науковий співробітник лабораторії обміну речовин к.с.-г.н. Є.О. Дзень, ветеринарний лікар Тов «Карпатський панон» Ю. Ю. Русин  
(прізвище, ім'я, по-батькові, установа, господарство, посада)

6. Умови проведення перевірки: \_\_\_\_\_ в умовах господарства  
(господарсько-економічні, відповідність встановленим вимогам)

7. Обсяг виробничої перевірки 80 самиць кролематок  
(голів і т. інш.)

8. Строки виробничої перевірки 22.05.2009 - 30.06. 2009  
(початок, кінець)

9. Методика виробничої перевірки: посилення репродуктивної функції, підвищення рівня запліднення та приживлення ембріонів самиць з метою посилення ембріонально-маткових взаємодій – контрольна група (n=20) основний раціон господарства, 1-ша дослідна група (n=20) - додатково до основного раціону вводили хром-метіонін в дозі 10 мкг/голову на добу, 2-а дослідна група (n=20) – 25 мкг/голову на добу хром-метіоніна, 3-а дослідна група (n=20) – 50 мкг/голову на добу хром-метіоніна.  
(коротка характеристика застосованого методу перевірки)

10. Результати обліку, які характеризують ефективність апробованих НДР у порівнянні з контролем:

а) основні господарські дані за підсумками перевірки. В результаті впровадження (використання) розробки: додавання хром-метіоніну до основного раціону посилює ефект множинної овуляції, що супроводжується збільшенням кількості жовтих тіл та одержанням якісних ембріонів, зниження ембріональної смертності в доїмплантаційний період (1-а та 2-а дослідні групи) та постімплантаційний період (3-а дослідна група).

(середньо-добовий приріст, надій молока, настриг вовни)

б) обґрунтований розрахунок економічного ефекту: одержання додаткового приплоду

11. Що рекомендується для впровадження у виробництво: застосування хром-метіоніну для стимуляції стимуляції овуляторної функції кролиць та приживлення ембріонів


Старший науковий співробітник  
лабораторії ембріональної біотехнології

Старший науковий співробітник  
лабораторії обміну речовин

Ветлікар

 /О.В.Штапенко

 /С.О.Дзень

 /Ю.Ю. Русин



## Додаток Ж



## АКТ

про впровадження (використання) наукової розробки

« 7 » липня 2015 р.

Ми, що нижче підписані, представники господарства (установи) Русин Ю. Ю.,  
ветлікар ТзОВ «Паннон Карпатський, Мукачівського району, Закарпатської області

(господарство, установа, спеціалісти)

З однієї сторони, і представники Інституту біології тварин НААН Штапенко  
О.В. старший науковий співробітник, к.с.-г. лабораторії репродуктивної біотехнології та  
розведення тварин, Гевкан І.І.; провідний науковий співробітник к.б.н.

(п.і.п., посада, вчений ступінь)

з другої сторони, склали даний акт про те, що у вказаному господарстві (установ)  
проведено впровадження (використання) закінченої наукової розробки “Дослідити  
особливості інтенсифікації репродуктивної функції у тварин під впливом застосування комплексного  
препарату наносполук та органічних мікроелементів у формі ліпосомальних препаратів”.

(назва і короткий зміст)

Строки виконання (початок, кінець): травень-липень 2015 р.

Обсяг голів 200

(голів і т.д.)

У результаті впровадження (використання) розробки виконання:  
За період дослідів

Акт складено у 3-ох примірниках.

Представник господарства:

Русин Ю.Ю.

Представник інституту (установи)

Штапенко О.В.

Гевкан І.І.

## Додаток 3

ЗАТВЕРДЖУЮ



ЗАТВЕРДЖУЮ



АКТ

виробничої перевірки завершених  
науково-дослідних робіт

1. Найменування науково-дослідної установи-розробника: Інститут біології тварин НААН, лабораторія репродуктивної біотехнології та розведення тварин.  
(НДІ, дослідна станція, відділ, лабораторія і ін.)
2. Назва закінчених НДР, які поставлені на виробничу перевірку: Комплексний ліпосомальний препарат органічних сполук мікроелементів.
3. Автори завершених НДР: Штапенко О.В., старший науковий співробітник лабораторії репродуктивної біотехнології та розведення тварин, к.с.-г., Гевкан І.І., пров. н. сп., к.б.н., Сливчук Ю.І., с.н.с., к. вет.н., Сирватка В.Я., н.с.  
(прізвище, ім'я, по-батькові, посада, звання, наукова ступінь)
4. Завершені науково-дослідні роботи, рекомендовані до виробничої перевірки рішенням вченої ради Інституту біології тварин НААН  
(НДІ, дослідні станції та ін.)
5. Виробнича перевірка проводилась у: ТзОВ «Паннон Карпатський» Мукачівського району, Закарпатської області  
(назва господарства, підприємства, місце знаходження)
6. Відповідальні за проведення виробничої перевірки: від ІБТ НААН - старший науковий співробітник лабораторії репродуктивної біотехнології та розведення тварин к.с.-г. Штапенко О.В., провідний науковий співробітник к.б.н. Гевкан І.І.; від господарства - ветеринарний лікар ТзОВ «Паннон Карпатський» Русин Ю. Ю.  
(прізвище, ім'я, по-батькові, установа, господарство, посада)
7. Умови проведення перевірки: Годівля та утримання здійснювались згідно прийнятих норм  
(господарсько-економічні, відповідність встановленим вимогам)
8. Об'єм виробничої перевірки 90 кролематок  
(голів і т. інш.)
9. Термін проведення виробничої перевірки березень-квітень 2015 року  
(початок, кінець)
10. Методика виробничої перевірки: Виробничу перевірку проводили з метою розробки комплексного препарату органічних сполук мікроелементів у формі ліпосомальних препаратів. Кролицям 1-ї дослідної групи за 14 днів до осіменіння підкирно вводили ліпосомальний препарат органічних сполук мікроелементів в дозі 5 мл/голову, кролематкам 2-ї дослідної групи ліпосомальний препарат з мікроелементами вводили в дозі 5 мл/голову при осіменінні. Після родів визначали відсоток запліднення та кількість отриманого приплоду.  
(коротка характеристика застосованого методу перевірки)
11. З яким контролем проводилось порівняння закінчених досліджень  
Кролематкам контрольної групи при осіменінні вводили ізотонічний розчин натрію хлориду.

**12. Результати обліку, які характеризують ефективність апробованих НДР, що перевіряються у порівнянні з контролем:**

Результати ефективності проведеної роботи характеризувалися за показниками відтворювальної здатності кролиць та кількістю приплоду на одну самицю дослідних та контрольних кролематок. Так, після введення комплексного препарату органічних сполук мікроелементів у формі ліпосомальної емульсії за 14 днів до осіменіння рівень запліднення становив 86,7%, а при введенні препарату при осіменінні – 80%, що на 18,3 % та 9,1% вище порівняно з тваринами контрольної групи. Кількість кроленят на 20-ту добу життя у 1-ї та 2-ї дослідних групах, яким вводили ліпосомальний препарат з мікроелементами в дозі 5 мл/голову, була відповідно вищою на 10,8% та 8,2% порівняно з з контрольною групою.

**13. Що рекомендується для освоєння у виробництві.** З метою стимуляції овуляторної функції та посилення ефекту множинної овуляції кролиць комплексний препарат органічних сполук мікроелементів у формі ліпосомальної емульсії рекомендується вводити за 14 днів до осіменіння підшкірно в дозі 5 мл/голову. Для підвищення приживлення ембріонів та одержання додаткового приплоду ліпосомальний препарат з мікроелементами рекомендується вводити в дозі 5 мл/голову при осіменінні.

**14. Відповідальні виконавці виробничої перевірки:**

а) від наукової установи

Штапенко О.В., старший науковий співробітник, к.с.-г.

Гевкан І.І., провідний науковий співробітник к.б.н.

б) від виробництва (господарства)

Русин Ю. Ю., ветеринарний лікар

Акт складений

« 26 » травня 2015 р.







УКРАЇНА

(19) UA (11) 56695 (13) U

(51) МПК (2011.01)

A23K 1/18

A23K 1/22

A23L 1/305

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ЗНИЖЕННЯ РІВНЯ ЕМБРІОНАЛЬНОЇ СМЕРТНОСТІ У КРОЛЕМАТОК

1

2

(21) u201008053

(22) 29.06.2010

(24) 25.01.2011

(46) 25.01.2011, Бюл. № 2, 2011 р.

(72) ШТАПЕНКО ОКСАНА ВСЕВОЛОДІВНА, ГЕВ-  
КАН ІВАН ІВАНОВИЧ, ДЗЕНЬ ЄВГЕНІЙ ОЛЕКСІ-  
ЙОВИЧ, ФЕДОРОВА СВІТЛАНА ВОЛОДИМИРІВ-  
НА

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААНУ

(57) Спосіб зниження рівня ембріональної смертності у кролематок, який включає використання органічної сполуки хрому, який відрізняється тим, що кролематкам задають з водою хром-метіонін в дозі від 373 до 746 мкг/тв./добу, попередньо розчинений у фізіологічному розчині хлориду натрію, впродовж 6 тижнів до викликання охоти та штучного осіменіння.

Корисна модель відноситься до сільського господарства, зокрема до галузі кролівництва, а саме до способів підвищення рівня запліднюваності кролематок за рахунок зниження рівня ембріональної смертності і може бути використана у господарствах з різними формами власності по вирощуванню кролів.

Відомі способи підвищення рівня запліднюваності кролематок, що включають згодовування добавок біологічно активних речовин, зокрема амінокислот, мікроелементів, вітамінів до їх раціону.

Патент №17291А України, МПК А61D 19/02, А01К 67/02 Спосіб стимуляції приживлюваності ембріонів у самок сільськогосподарських тварин та препарат "Глютам" для використання в ньому / Шеремета В.І., Богданов Г.О., Опанасенко В.О., Лушчик А.А. №95125209; Заявл. 11.12.95; Опубл. 01.04.97. Бюл. №4.

Патент № 6101 А України. Комплексний мінерально-вітамінний препарат для профілактики мікроелементозів молодняку сільськогосподарських тварин /В.Г. Герасименко, В.С. Бітюцький, О.М. Мельниченко, М.О. Герасименко // № А 61К33/26, Опубл. 15.04.2005, Бюл. №4.

Недоліком цих способів є їх недостатня ефективність, оскільки вони не нормуються органічними або неорганічними сполуками хрому і не забезпечують максимального продуктивного та економічного ефекту.

Найбільш близьким по суті рішенням до заявленого способу є Kazim Sahin (1999): The effect of

chromium added into basal diet on serum total protein, urea, triglyceride, cholesterol and serum and tissue chromium, zinc, copper levels in rabbits. In Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences, 109-113.

Недоліком цього способу є задавання хлориду хрому у складі преміксу, що значно обмежує кількість хрому, який всмоктується в шлунково-кишковому тракті.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки прото типу і завдяки застосування хелатної сполуки хрому - хром-метіоніну забезпечує зростання рівня запліднюваності кролематок за рахунок стимуляції ембріонально-маткового сигналу та зниження рівня ембріональної смертності у кролематок.

В основі корисної моделі поставлено завдання - підвищення рівня запліднюваності кролематок та зниження ембріональної смертності у ранній період вагітності, завдяки стимуляції ембріонально-маткового сигналу.

Технічний результат досягається шляхом задавання з водою кролематкам хром-метіоніну в дозі від 373 до 746 мкг/тв./добу (доза чистого хрому в перерахунку становить від 25 до 50 мкг/тв./добу), попередньо розчиненого у фізіологічному розчині хлориду натрію, впродовж 6 тижнів перед заплідненням до викликання охоти та штучного осіменіння.

Позитивний ефект способу пояснюється тим, що введення з водою хром-метіоніну в дозі від 373 до 746 мкг/тв./добу позитивно впливає на використання організмом кролематок глюкози крові через опосередковану дію інсуліну та активує анаболіти-

(13) U  
(11) 56695  
(19) UA



Додаток К







УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105740** (13) **U**

(51) МПК (2016.01)

**A61K 31/00****A61D 19/00****A61P 3/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ****(21) Номер заявки:** **u 2015 05160****(22) Дата подання заявки:** **26.05.2015****(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель:** **11.04.2016****(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту:** **11.04.2016, Бюл.№ 7****(72) Винахідник(и):**

**Штапенко Оксана Всеволодівна (UA),  
Гевкан Іван Іванович (UA),  
Сливчук Юрій Іванович (UA),  
Дзень Євген Олексійович (UA),  
Сирватка Василь Ярославович (UA),  
Матюха Ірина Олегівна (UA),  
Федорова Світлана Володимирівна (UA)**

**(73) Власник(и):**

**ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН,  
вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034 (UA)**

**(54) ПРЕПАРАТ "ЛІПООРГАНІК" ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ВІДТВОРЮВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ КРОЛЕМАТОК****(57) Реферат:**

Препарат для підвищення відтворювальної здатності кролематок містить органічні сполуки мікроелементів. Додатково препарат містить глутамати цинку і марганцю, хром-метіонін та селеніт натрію у формі ліпосомальної емульсії з вітамінами А, D<sub>3</sub>, Е та F, лецитин, твін-20, дистильовану воду.

**UA 105740 U**







УКРАЇНА

(19) UA (11) 51687 (13) U

(51) МПК (2009)  
A61D 19/00  
G01N 22/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ИНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту(54) СПОСІБ АКТИВАЦІЇ ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН ЕПІТЕЛІЮ  
ЯЙЦЕПРОВОДІВ

1

(21) u201001506  
(22) 15.02.2010  
(24) 26.07.2010  
(46) 26.07.2010, Бюл. № 14, 2010 р.  
(72) ГЕВКАН ІВАН ІВАНОВИЧ, НІКІТЕНКО АНАТОЛІЙ МЕФОДІЙОВИЧ, ШТАПЕНКО ОКСАНА ВСЕВОЛОДІВНА, СЛИВЧУК ЮРІЙ ІВАНОВИЧ, ФЕДОРОВА СВІТЛАНА ВОЛОДИМИРІВНА  
(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН УААН

2

(57) Спосіб активації проліферативних процесів в культурі клітин епітелію яйцепроводів, що включає її обробку електромагнітним випромінюванням, який відрізняється тим, що використовують електромагнітні випромінювання надвисокої частоти в діапазоні 30-300 ГГц, при цьому обробку здійснюють впродовж 3-9 хвилин одноразово перед початком 72-годинного культивування клітин.

Корисна модель відноситься до ветеринарної медицини безпосередньо до ембріології і може бути використаний при проведенні трансплантації ембріонів і, зокрема, при дозріванні ембріонів до трансферабельних стадій.

Відомі способи активації проліферативного росту клітин, що сприяють активації процесів регенерації тканин за рахунок проліферації клітин та підвищення інтенсивності розмноження інфузорій активації їх життєдіяльності та розширення адаптаційних можливостей. Нікітенко А. М. Спосіб активації процесу за живлення ран. [Текст] / Нікітенко А. М., Лясота В. П., Сидорук Ю. К., Малина В. В. / ДП на винахід 200041 Україна, Держ. Деп. Интел. Власності. Опубл. 14.02.2005.-Бюл. №2.-С. 1-6.

Нікітенко А.М. Спосіб розширення адаптивних можливостей живих істот. [Текст] / Нікітенко А. М., Лясота В. П., Малина В. В., Сидорук Ю. К. /ДП на винахід 55585А Україна, А01G7/04. Держ. Деп. Интел. Власності. - Заявл. 29.05.2001; Опубл. 15.04.2003.- Бюл. №4. — С 1-4.

Найбільш близьким по суті рішенням є спосіб використання джерела електромагнітного СВЧ-випромінювання низької інтенсивності на ріст і розвиток культури найпростіших з експозицією 30 хвилин, який проводився при безпосередній обробці відкритої чашки з культурою інфузорій. На другий день після опромінення інтенсивність розмноження збільшилась на 8%, на 5 добу - зросла до 18%, а на 7 добу кількість клітин, які розмножувалися

лись знизились до рівня контролю. Левина М. 3. Влияние СВЧ-облучения низкой интенсивности на рост и развитие культуры простейших. [Текст] / Левина М. 3., Веселого И.А., Белая Т.И./ В кн.:Миллиметровые волны в медицине и биологии. — Москва, —1989 —С. 189-195. Веселого И. А. Особенности функциональных перестроек биологических систем под внешнем воздействием. [Текст] / Веселого И. А., Левина М. 3./В кн.:Миллиметровые волны в медицине и биологии. — Москва, —1989 —С.195-198.

До недоліків вищезгаданого способу слід віднести те, що для активації процесів розмноження та розширення адаптаційних можливостей інфузорій було використано СВЧ-випромінювання низької інтенсивності з експозицією дії 30 хвилин, що є енергозатратним, сприяє збільшенню затрат праці. Електромагнітні хвилі, які випромінюються джерелом СВЧ-випромінювання є в вузькому діапазоні та мають низьку інтенсивність і в результаті не спроможні резонувати з водою та біомолекулами і структурними елементами клітин.

Відомо, що електромагнітні хвилі в міліметровому діапазоні по енергетичним параметрам спроможні активувати молекули різних біологічно активних речовин, в тому числі білки, ферменти і воду, вільну чи зв'язану з біологічними структурами ядра та цитоплазми клітин за рахунок активного поглинання квантів та переходу електронів молекул на більш високу орбіту. В результаті

(19) UA (11) 51687 (13) U







УКРАЇНА

(19) UA (11) 54749 (13) U

(51) МПК (2009)  
A01K 67/00  
C12M 3/00  
C12N 5/00  
A61D 19/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

# ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРОЛІФЕРАЦІЇ КЛІТИН РІЗНИХ ТИПІВ

1

2

(21) u201005025

(22) 26.04.2010

(24) 25.11.2010

(46) 25.11.2010, Бюл.№ 22, 2010 р.

(72) СЛИВЧУК ЮРІЙ ІВАНОВИЧ, ГЕВКАН ІВАН  
ІВАНОВИЧ, ФЕДОРОВА СВІТЛАНА  
ВОЛОДИМИРІВНА, ШТАПЕНКО ОКСАНА  
ВСЕВОЛОДІВНА, СИРВАТКА ВАСИЛЬ  
ЯРОСЛАВОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААНУ

(57) Середовище для підвищення активності  
проліферації клітин різних типів, яке містить в  
своєму складі неорганічні солі, амінокислоти,  
вітаміни та інші біологічно активні речовини, яке  
відрізняється тим, що до його складу додатково  
вводять сукцинат натрію в кількості 0,2-0,4 г/дм<sup>3</sup> і  
проводять культивування впродовж 72 годин при  
такому співвідношенні чинників:

Неорганічні солі, г/дм<sup>3</sup>

CaC1 <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,2
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> •9H <sub>2</sub> O	0,00072
MgSO <sub>4</sub> (безводна)	0,09767
KC1	0,4
Na ацетат (безводний)	0,05
NaHCO <sub>3</sub>	2,2
NaCl	6,8
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (безводна)	0,122

Амінокислоти, г/дм<sup>3</sup>

L-аланін	0,025
L-аргінін	0,07•НС1
L-аспарагінова кислота	0,03
L-цистин•НС1•Н <sub>2</sub> O	0,00011
L-цистеїн•2НС1	0,026
L-глутамінова кислота	0,0668
L-глутамін	0,1
Гліцин	0,05
L-гістидин НС1•Н <sub>2</sub> O	0,02188
Гідрокси-L-пролін	0,01
L-ізолейцин	0,02
L-лейцин	0,06
L-лізін	0,07•НС1
L-метіонін	0,015

L-фенілаланін	0,025
L-пролін	0,04
L-серин	0,025
L-треонін	0,03
L-триптофан	0,01
L-тирозин 2Na•2H <sub>2</sub> O	0,05766
L-валін	0,025

Вітаміни, г/дм<sup>3</sup>

Аскорбінова кислота•Na	0,0000566
Д-біотин	0,00001
Кальциферол	0,0001
Холін хлорид	0,0005
Фолієва Менадіону (натрію бісульфіт)	0,000016
Міо-інозитол	0,00005
Ніацинамід	0,000025
Нікотинова кислота	0,000025
п-амінобензойна кислота	0,00005
D-пантотенова кислота•SCa	0,00001
Піридоксаль•НС1	0,000025
Піридоксин НС1	0,000025
Ретинолу ацетат	0,00014
Рибофлавін	0,00001
DL-α-токоферолу - фосфат•Na	0,00001
Тіамін НС1	0,00001

Інші біологічно активні речовини, г/дм<sup>3</sup>

Аденін сульфат	0,01
Аденозин трифосфат • 2Na	0,001
Аденозин монофосфат•Na	0,0002385
Холестерин	0,0002
Дезоксирибоза	0,0005
Глюкоза	1,0
Глутатіон	0,00005
Гуанін•НС1	0,0003
Гіпоксантин	0,0003
Фенол Червоний•Na	0,0213
Твін-80	0,02
Рибоза	0,0005
Тимін	0,0003
Урацил	0,0003
Ксантин•Na	0,000344
Сукцинат натрію, г/дм <sup>3</sup>	0,2-0,4.

(13) U  
(11) 54749  
(19) UA







УКРАЇНА

(19) UA (11) 47452 (13) U

(51) МПК (2009)  
A01K 67/00  
C12N 5/00  
C12N 15/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ФІДЕРНИХ КЛІТИН ЯЙЦЕПРОВОДІВ

1

(21) u200904658  
(22) 12.05.2009  
(24) 10.02.2010  
(46) 10.02.2010, Бюл. № 3, 2010 р.  
(72) МАДІЧ АЛЛА ВСЕВОЛОДІВНА, ГЕВКАН ІВАН ІВАНОВИЧ, ШТАПЕНКО ОКСАНА ВСЕВОЛОДІВНА, СЛИВЧУК ЮРІЙ ІВАНОВИЧ, ФЕДОРОВА СВІТЛАНА ВОЛОДИМИРІВНА  
(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН УААН  
(57) Спосіб одержання фідерних клітин яйцепроводів, який включає механічне подрібнення фрагментів тканини, відмивання клітин у середовищі, культивування їх у розчині трипсину, центрифугу-

2

вання гомогенату, який відрізняється тим, що для одержання культури високої активності та очистки проводять 3-разову трипсинізацію 0,5 % розчином трипсину етилендіамінтетраоцтова кислота (1:1) та культивування впродовж 25 хвилин при 37 °С, відмиванням суспензії клітин від трипсину шляхом центрифугування у середовищі DMEM впродовж 10 хвилин при 1000 об/хв, відмивання і нейтралізацію трипсину здійснюють додаванням середовища DMEM з бичачим сироватковим альбуміном та центрифугуванням впродовж 2 хвилин при 1000 об/хв.

Корисна модель належить до галузі репродуктивної біотехнології, зокрема, до ембріобіотехнологічних досліджень *in vitro* при стимуляції процесів оогенезу, одержанні ембріонів трансферабельних стадій.

Відома методика отримання культури фідерних клітин (Voelkel S.A., Amborski G.F., Hill K.G., Godke R.A. Use of a uterine-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos // Theriogenology. - 1985. - Vol. 24., №3. - P.271-281), яка полягає в культивуванні шматочків тканини (до 2мм) впродовж 2 тижнів, обробці клітин 0,05% трипсину у збалансованому солевому розчині Хенкса.

Недоліком цього способу є те, що для отримання культури клітин використовують культивування шматочків тканин, а це в свою чергу приводить до тривалого процесу отримання готової культури.

Найбільш близьким по суті до засобу, що заявляється є метод отримання культури фідерних клітин яйцепроводів (S.Woldesenbet, G.R.Newton Comparison of proteins synthesized by polarized caprine oviductal epithelial cells and oviductal explants *in vitro* // Theriogenology. - 2003. - Vol.60 (3). - P. 533-543), який полягає в механічному подрібненні фрагментів яйцепроводу, відмиванні клітин у HBSS та короткотривалому (10хв) культивуванні епітеліальних клітин у розчині трипсину.

Недоліком цього способу є те, що для отримання ізольованої культури клітин яйцепроводів проводять одноразову трипсинізацію та центрифугування культури, що є недостатнім для одержання культури високої активності та очистки.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки прототипу і дозволяє отримати культуру високої життєздатності та проліферативної активності за рахунок модифікації деяких методичних елементів; послідовній трьохразовій обробці зразків гомогенизованих тканин розчином трипсину з наступним центрифугуванням.

В основу корисної моделі поставлено завдання розробити спосіб одержання моношару з ізольованих епітеліальних клітин яйцепроводів, який характеризується стійким проліферативним ростом, спрямований на стимуляцію процесів оогенезу, відновлення мітотичного дроблення ембріонів.

Технічний результат досягається проведенням 3-х разової обробки тканини яйцепроводів 0,5% розчином трипсину з наступним центрифугуванням, що дозволяє отримати культуру фідерних клітин з високою життєздатністю та проліферативною активністю.

Отже, використання зазначеного способу отримання первинної культури фідерних клітин за рахунок удосконалення методичних прийомів було отримано моношар з ізольованих епітеліальних

(19) UA (11) 47452 (13) U